

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE MEDICINA DE LISBOA



# **Seleccção e caracterização de anticorpos de domínio único específicos para a proteína gp41 de VIH-1**

Versão confidencial

Sara Ferreira Llorente Grancho Lourenço

Mestrado em Doenças Infecciosas Emergentes

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE MEDICINA DE LISBOA



# **Seleccção e caracterização de anticorpos de domínio único específicos para a proteína gp41 de VIH-1**

Sara Ferreira Llorente Grancho Lourenço  
Mestrado em Doenças Infecciosas Emergentes

Dissertação orientada pelo Doutor Frederico Aires da Silva e  
co-orientada pela Prof. Doutora Emília Valadas

Todas as afirmações efectuadas no presente documento são da  
exclusiva responsabilidade do seu autor, não cabendo qualquer  
responsabilidade à Faculdade de Medicina de Lisboa pelos conteúdos nela  
apresentados.

A impressão desta dissertação foi aprovada pela comissão coordenadora do conselho científico da Faculdade de Medicina de Lisboa a 19 de Abril de 2011

## **Agradecimentos**

A realização deste projecto foi pautada pela aprendizagem, crescimento profissional e pessoal, pelo que constituiu uma etapa importante para mim. A todos os que me apoiaram neste projecto gostaria de expressar os meus agradecimentos:

À empresa Technophage SA por ter permitido a realização deste projecto nas suas instalações, por ter proporcionado todos os meios e condições necessárias e por toda a compreensão e ajuda ao longo destes dois anos.

Ao Doutor Frederico Aires da Silva, meu orientador, um especial agradecimento pela orientação científica, pelo apoio incondicional, pela disponibilidade, amizade e pela confiança em mim depositada.

À Prof. Doutora Emília Valadas, minha co-orientadora, por ter aceite a co-orientação desta tese e pela orientação e ajuda facultada durante todo o projecto.

À D. Belmira Carrapiço da Faculdade de Veterinária de Lisboa por toda a ajuda na manipulação animal e pelo entusiasmo.

À Catarina Santos pela ajuda nos ensaios celulares, pela enorme paciência e pelo apoio e palavras de incentivo.

À Doutora Sofia Côrte-Real, por toda a ajuda, carinho, apoio, incentivo e amizade demonstradas ao longo deste mestrado.

Aos meus colegas de laboratório, agradeço o companheirismo e camaradagem. O bom ambiente proporcionado, a descontração e os momentos de riso tornaram mais fácil cada momento deste projecto.

À minha família, um enorme agradecimento pelo apoio incondicional e pelas palavras de incentivo que me acompanharam durante todo o projecto. Obrigado por acreditarem em mim!

Ao Norberto que, mesmo sem ter conseguido assistir ao terminar desta fase importante do meu percurso profissional e pessoal, muito me ajudou. Obrigada pela partilha de experiências, conselhos, apoio, descontração e amizade. Até sempre...

Aos meus amigos Marisa e Ricardo, o merecido reconhecimento pelo apoio incondicional, pela enorme amizade demonstradas, por me terem ouvido e me terem ajudado nas alturas mais difíceis... por me terem feito sentir melhor nos piores momentos. Sem o vosso apoio teria sido mais difícil...

Aos meus restantes amigos, que mesmo sem os referir pessoalmente, me ajudaram durante todo este ano e me deram forças para continuar em frente.

## Resumo

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) é uma patologia imunossupressora cujos agentes etiológicos são os Vírus da Imunodeficiência Humana tipo-1 e tipo-2 (VIH-1 e VIH-2), ambos retrovírus pertencentes à família dos lentivírus. Esta patologia reflecte a fase final da infecção por VIH, quando o sistema imune do indivíduo infectado se encontra gravemente afectado, perdendo a capacidade de defesa contra agentes estranhos. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que cerca de 36 milhões de pessoas se encontrem infectadas por VIH e que aproximadamente 20 milhões já morreram devido à doença, originando um número, com tendência crescente, de 56 milhões de pessoas até 2012.

Nos últimos anos ocorreram avanços significativos no tratamento da infecção por VIH e SIDA. A aplicação de combinações de agentes anti-retrovíricos levou, em muitos casos, a um declínio substancial na incidência da SIDA e da mortalidade associada nos países desenvolvidos. No entanto, o desenvolvimento de resistências virais aos fármacos utilizados tem-se tornado uma enorme barreira, tendo vindo a aumentar a percentagem de indivíduos infectados por VIH-1 que possuem vírus resistentes a pelo menos uma medicação anti-retrovírica. Novas terapias e outros alvos mais promissores necessitam surgir rapidamente, com o objectivo de combater as formas mais resistentes de VIH que já circulam pelo mundo.

Neste contexto, este trabalho teve como objectivo seleccionar anticorpos de domínio único específicos para a proteína transmembranar gp41 de VIH-1, a partir de uma biblioteca *naïve* de anticorpos VL de coelho. Estes anticorpos pelas suas reduzidas dimensões podem ter a capacidade de se ligar mais facilmente a regiões pouco acessíveis da proteína gp41 e bloquear assim o processo de fusão e impedir a entrada do

vírus na célula hospedeira. Para tal, construiu-se uma biblioteca *naïve* de anticorpos VL de coelho e seleccionou-se uma *pool* de anticorpos específicos para a proteína gp41 e domínio HR1 por *phage display*. A partir desta *pool* de anticorpos seleccionaram-se quatro clones diferentes que apresentaram elevados níveis de expressão e especificidade para as moléculas alvo. Ensaios celulares foram realizados com o objectivo de analisar a capacidade de inibição da fusão do envelope viral com o receptor CD4 mediada pelos VLs. Os anticorpos identificados demonstraram ter a capacidade de inibir a fusão envelope/CD4 sendo esta inibição dependente da concentração de anticorpo presente.

Estes resultados sugerem assim que estes anticorpos poderão ser uma abordagem bastante promissora para o desenvolvimento de novas moléculas na terapêutica anti-retrovírica. Por outro lado, podem também ser utilizados como “ferramentas” no estudo conformacional da proteína gp41, no seu mapeamento e estudo do processo de fusão.

**Palavras chave:** VIH-1, gp41, inibidor de fusão, terapêutica, anticorpos domínio único

## **Abstract**

Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) is an immunosuppressor disease whose etiological agents are Human Immunodeficiency Virus type 1 and 2 (HIV-1 and HIV-2). Both are retrovirus, belonging to lentivirus family. AIDS is the late stage of HIV infection, when the immune system is severely damaged and has difficulty fighting diseases and certain cancers.

World Health Organization (WHO) estimates that 36 million people are infected with HIV and approximately 20 million individuals have died from AIDS.

In the last years, the most significant progress in the battle against HIV/AIDS has been the development of therapy strategies based on the combination of different antiretroviral drugs, also known as Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART), that provide important treatment options and the increasing of life-time for HIV infected patients. Antiretroviral therapy has led to an increase of life-time and a significant decrease in mortality associated with infection by HIV.

In spite of the significant advances in the antiretroviral therapy, drug resistance has become a serious problem. The number of people infected with HIV-1 with resistance to, at least, one antiretroviral drug, is increasing.

It seems to be impossible to eradicate HIV/AIDS with actual antiretroviral therapy strategies. New targets, new drugs and novel antiretroviral therapy strategies are necessary to stop the emergence of HIV-1 drug resistant strains that exist all over the world.

The main goal of this project was the selection of specific single domain antibodies from a naïve library against gp41 that could inhibit the HIV-1 infection process, by binding to inaccessible sites of gp41.



To achieve this goal, a naïve antibody library was constructed and a pool of VL antibodies specific for gp41 and HR1 were selected by phage display. From these, four different antibodies were chosen that showed the best values of expression and binding to target molecules. Cellular assays were performed to verify the ability to inhibit the fusion process of the viral envelope with CD4 by VLs.

The selected antibodies have the ability to inhibit the fusion process between HIV-1 envelope and CD4, being the inhibition dependent on the concentration of antibody present. These antibodies may, eventually, be applied to antiretroviral therapy and to the conformational study of gp41, in its mapping, and to the study of the fusion process.

**Keywords:** HIV-1, gp41, fusion inhibitors, therapy, single domain antibodies

## Abreviaturas

ABTS	<i>2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)</i>
Anti-HA-HRP	Anticorpo <i>anti-hemagglutinin-horseradish peroxidase</i>
BCP	Bromo-cloropropano
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
C	Terminal carboxílico
CA	Cápside
CCR5	Co-receptor celular CCR5
cDNA	DNA complementar
CD4	Receptor celular
CDR	<i>Complementary Determining Region</i>
CH	Domínio constante da cadeia pesada de um anticorpo
CHR	Região C-terminal do ectodomínio da gp41
CL	Domínio constante da cadeia leve de um anticorpo
CPRG	<i>Chlorophenolred-β-D-galactopyranoside</i>
CXCR4	Co-receptor celular CXCR4
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DO	Densidade óptica
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
<i>env</i>	<i>Envelope</i>
EUA	Estados Unidos da América
Fab	<i>Fragment antigen binding</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FP	<i>Fusion peptide</i>
<i>gag</i>	<i>Group-specific antigen</i>
h	Horas
HAART	<i>Highly Active Antiretroviral Therapy</i>
HR1	<i>Heptad repeat region 1</i>
HR2	<i>Heptad repeat region 2</i>
IgG	Imunoglobulina G
IN	Integrase

IPTG	<i>Isopropyl <math>\beta</math>-D-1-thiogalactopyranoside</i>
LB	Meio <i>Luria-Bertani</i>
LTRs	<i>Long Terminal Repeats</i>
MA	Matriz
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
min	Minutos
MPER	<i>Membrane Proximal External Region</i>
mRNA	RNA mensageiro
N	Terminal amina
NC	Nucleocápside
Nef	<i>Negative factor</i>
NHR	Região N-terminal do ectodomínio da gp41
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEG8000	Polietilenoglicol 8000
<i>pol</i>	<i>Polymerase</i>
PR	Protease
pT7-PL	<i>pT7-Peptide Leader</i>
Rev	<i>Regulator of virion expression</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RT	<i>Reverse transcriptase</i>
SB	Meio <i>Super Broth</i>
scFv	<i>Single-chain variable fragment</i>
sdAb	<i>Single-domain antibody</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SU	Proteína de superfície
TARc	Terapêutica anti-retrovírica combinada
Tat	<i>Transcriptional transactivator</i>
TM	Proteína transmembranar
VIScpz	Vírus da Imunodeficiência Símia de chimpanzés
VISsm	Vírus da Imunodeficiência Símia de macacos <i>sooty mangabey</i>
V	Volume

VH	Domínio variável da cadeia pesada de um anticorpo
Vif	<i>Virion infectivity factor</i>
VIH	Vírus da Imunodeficiência Humana
VL	Domínio variável da cadeia leve de um anticorpo
Vpr	<i>Viral protein regulatory</i>
Vpu	<i>Viral protein U</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
6HB	<i>Six-Helix Bundle</i>

## Índice de figuras

	Página
Fig.1 – Relação filogenética dos vários subtipos e das formas recombinantes existentes	3
Fig.2 – Estimativa, a nível mundial, do número de adultos e crianças infectados por VIH em 2009	4
Fig.3 – Representação esquemática da partícula viral VIH	5
Fig.4 – Representação do genoma e proteoma de VIH-1	6
Fig.5 – Representação esquemática do ciclo de replicação de VIH-1	8
Fig.6 – Representação esquemática da localização e estrutura conformacional das glicoproteínas gp120 e gp41 na membrana viral de VIH-1	15
Fig.7 – Representação esquemática dos domínios constituintes da proteína gp41	16
Fig.8 – Esquema representativo do processo de fusão da membrana viral de VIH-1 com a membrana plasmática da célula alvo	18
Fig.9 – Esquema representativo do local e modo de acção das classes 1 e 2 de inibidores de fusão	19
Fig.10 – Esquema representativo da estrutura de um anticorpo com realce das regiões variáveis e constantes das cadeias leve e pesada	24
Fig.11 – Exemplos de fragmentos de anticorpos	26
Fig.12 – Representação esquemática de sdAb	28
Fig.13 – Esquema representativo de um ciclo de selecção ( <i>panning</i> ) de <i>phage display</i>	34
Fig.14 – Esquema de amplificação das várias famílias de VL com os respectivos oligonucleótidos	41
Fig.15 – Gel de agarose a 1.5% com as amostras de RNA e cDNA do baço e medula óssea	60
Fig. 16 – Amplificação, por PCR, a partir de cDNA do baço, dos genes que codificam para as famílias de VL	61
Fig. 17 – Amplificação, por PCR, a partir de cDNA de medula óssea, dos genes que codificam para as famílias de VL	61
Fig. 18 – Gel de agarose a 2% (TAE1x) da purificação dos fragmentos correspondentes aos domínios VL do baço amplificados por PCR	62

Fig. 19 – Gel de agarose a 2% (TAE 1x) da purificação dos fragmentos correspondentes aos domínios VL da medula óssea amplificados por PCR	63
Fig. 20 – Gel de agarose a 2% (TAE 1x) da purificação dos fragmentos correspondentes aos domínios VL do baço e medula óssea digeridos com SfiI	63
Fig. 21 – Gel de agarose a 1.5% (TBE 0.5x) com os produtos PCR resultantes da amplificação dos insertos clonados	64
Fig. 22 – Relação dos <i>inputs</i> e <i>outputs</i> nos quatro ciclos de <i>pannings</i> efectuados na selecção de anticorpos VL contra gp41	65
Fig. 23 – Relação dos <i>inputs</i> e <i>outputs</i> nos quatro ciclos de <i>pannings</i> efectuados na selecção de anticorpos VL contra HR1	66
Fig. 24 – Purificação dos anticorpos VL anti-gp41 e anti-HR1 digeridos com SfiI	67
Fig. 25 – Gel de agarose 1.5% (TBE 0.5x) de confirmação de insertos nos clones obtidos da transformação dos VL anti-gp41 e anti-HR1 em <i>E.coli</i> BL21	68
Fig. 26 – Valores de ligação à gp41 e BSA, obtidos do robot, para os 384 clones analisados de VL anti-gp41	69
Fig. 27 – Valores de ligação à gp41 e BSA, obtidos do robot, para os 384 clones analisados de VL anti-HR1	69
Fig. 28 – Ensaio de ELISA para avaliação da ligação ao antigénio dos anticorpos VL anti-gp41 seleccionados	70
Fig. 29 – Ensaio de ELISA para avaliação da ligação ao antigénio dos anticorpos VL anti-HR1 seleccionados	71
Fig. 30 – Ensaio de ELISA para avaliação da ligação dos anticorpos VL anti-gp41 seleccionados contra a gp41, HR1 e BSA	72
Fig. 31 – Ensaio de ELISA para avaliação da ligação dos anticorpos VL anti-HR1 seleccionados contra a gp41, HR1 e BSA	72
Fig. 32 – Homologia entre as sequências aminoacídicas dos clones VL anti-gp41 obtidos	73
Fig. 33 – Homologia entre as sequências aminoacídicas dos clones VL anti-HR1 obtidos	73

Fig. 34 – Avaliação do grau de pureza dos clones VL anti-gp41 purificados	75
Fig. 35 – Avaliação do grau de pureza dos clones VL anti-HR1 purificados	75
Fig. 36 – Ensaio de inibição, pelos VL anti-gp41, do processo de fusão entre o envelope viral de VIH-1 expresso à superfície das células HeLa243env e o receptor CD4 expresso à superfície das células HeLa CD4 LTR- $\beta$ -Gal	77
Fig. 37 – Ensaio de inibição, pelos VL anti-HR1, do processo de fusão entre o envelope viral de VIH-1 expresso à superfície das células HeLa243env e o receptor CD4 expresso à superfície das células HeLa CD4 LTR- $\beta$ -Gal	77

## Índice de tabelas

	Página
Tabela 1 – Nome e sequência dos oligonucleótidos utilizados para amplificação dos genes que codificam para os anticorpos de domínio único VL de coelho	41
Tabela 2 – Componentes e respectivas quantidades adicionadas para cada reacção de PCR	42
Tabela 3 – Condições de PCR utilizadas para amplificação das famílias de anticorpos VL	42
Tabela 4 – Componentes e respectivas quantidades utilizadas na digestão do vector pComb3X-SS	44
Tabela 5 – Componentes e respectivas quantidades utilizadas na digestão dos produtos PCR correspondentes aos domínios VL	45
Tabela 6 – Componentes e respectivas quantidades utilizadas na clonagem dos domínios VL no vector pComb3X	46
Tabela 7 – Componentes e respectivas quantidades adicionadas para cada reacção de PCR para verificação de inserto nos clones obtidos	47
Tabela 8 – Nome e sequência dos oligonucleótidos utilizados para verificação da presença dos genes que codificam para os anticorpos de domínio único VH e VL clonados no vector pComb3X	48
Tabela 9 – Resumo das condições utilizadas em cada ciclo de selecção do <i>phage display</i>	50
Tabela 10 – Componentes e respectivas quantidades utilizadas na digestão do vector pT7-PL	51
Tabela 11 – Componentes e respectivas quantidades utilizadas na digestão dos domínios VL dos DNAs do 4º <i>panning</i> do <i>phage display</i>	51
Tabela 12 – Componentes e respectivas quantidades utilizadas na clonagem dos domínios VL no vector pT7-PL	52
Tabela 13 – Valores de <i>input</i> e <i>output</i> obtidos nos diferentes ciclos de <i>phage display</i> para a gp41	65
Tabela 14 – Valores de <i>input</i> e <i>output</i> obtidos nos diferentes ciclos de <i>phage display</i> para o HR1	66



## Índice

	Página
Agradecimentos	I
Resumo	III
Abstract	V
Abreviaturas	VII
Índice de figuras	X
Índice de tabelas	XIII
Índice	XIV
Capítulo 1 – Introdução teórica	1
1.1 – Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) e Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA)	2
1.1.1 – Origem e diversidade de VIH	2
1.1.2 – Estrutura e organização genómica de VIH	5
1.1.3 – Ciclo de replicação de VIH-1	7
1.2 – VIH e terapêutica anti-retrovírica	10
1.2.1 – Inibidores de entrada	12
1.3 - A glicoproteína gp41: um ponto-chave no processo de fusão	15
1.3.1 – Estrutura e importância da gp41	15
1.3.2 – A função da gp41 no processo de fusão	17
1.3.3 – A proteína gp41 de VIH-1 como alvo terapêutico	18
1.4 – Anticorpos monoclonais e anticorpos de domínio único	22
1.4.1 – Sistema imunitário e resposta humoral	22
1.4.2 – Características e propriedades dos anticorpos	23
1.4.3 – Fragmentos de anticorpos recombinantes	26
1.4.4 – Anticorpos de domínio único	27
1.5 – Tecnologia de <i>phage display</i>	31
1.5.1 – Bibliotecas de anticorpos	31
1.5.2 – Selecção de anticorpos por <i>phage display</i>	32
1.6 – Objectivos	35
Capítulo 2 – Materiais e métodos	38

2.1 – Construção de bibliotecas <i>naïve</i> de anticorpos de domínio único VL derivada de coelhos	39
2.1.1 – Obtenção de baço e medula óssea de coelho	39
2.1.2 – Extração de mRNA de coelho	39
2.1.3 – Síntese cDNA	40
2.1.4 – Amplificação, por PCR, dos genes correspondentes às famílias de sdAb VL	41
2.1.5 – Precipitação dos produtos PCR correspondentes aos domínios VL	43
2.1.6 – Purificação dos produtos PCR dos domínios VL	43
2.1.7 – Digestão com SfiI dos DNAs dos produtos PCR correspondentes aos domínios VL purificados	44
2.1.8 – Clonagem dos domínios VL no vector pComb3X	46
2.1.9 – Ensaio de PCR para verificação da existência de inserto nos clones obtidos	47
2.2 – Selecção de sdAb específicos contra a gp41 e HR1, por <i>phage display</i>	48
2.3 – <i>Screening</i> e caracterização dos anticorpos de domínio único seleccionados	50
2.3.1 – Clonagem dos genes dos sdAb seleccionados, por <i>phage display</i> , no vector pT7-PL (pT7- <i>peptide leader</i> )	50
2.3.2 – Selecção dos anticorpos específicos para gp41 e HR1	53
2.3.3 – Ensaio de expressão e ligação à proteína alvo	55
2.3.4 – Sequenciação e análise de semelhanças dos clones de VL anti-gp41 e anti-HR1	56
2.3.5 – Expressão e purificação dos quatro clones de VL anti-gp41 e anti-HR1	56
2.4 - Ensaio celular de inibição da fusão envelope viral/CD4 pelos VL anti-gp41 e anti-HR1	57
Capítulo 3 – Resultados	59
3.1 – Construção de bibliotecas <i>naïve</i> de anticorpos de domínio único VL, derivada de coelhos	60
3.1.1 – Extração de RNA de coelho e síntese de cDNA	60
3.1.2 – Amplificação, por PCR, dos genes correspondentes às famílias de sdAb VL	61

3.1.3 – Purificação e clonagem dos fragmentos correspondentes aos domínios VL de baço e medula óssea no vector pComb3X	62
3.1.4 – Selecção de sdAb específicos contra a proteína gp41 e domínio HR1, por <i>phage display</i>	64
3.2 – <i>Screening</i> e caracterização dos anticorpos de domínio único seleccionados contra a proteína gp41 e domínio HR1	67
3.2.1 – Clonagem dos genes dos sdAb seleccionados contra a gp41 e HR1, por <i>phage display</i> , no vector pT7	67
3.2.2 – Selecção dos anticorpos específicos para a proteína gp41 e domínio HR1 com recurso ao sistema automatizado Hamilton	68
3.2.3 – Confirmação da expressão e ligação à proteína alvo, dos clones seleccionados no robot	70
3.2.4 – Ensaio de ligação à proteína gp41 e domínio HR1 dos anticorpos VL anti-gp41 e anti-HR1	71
3.2.5 – Análise das sequências e determinação de homologias dos anticorpos VL anti-gp41 e VL anti-HR1 seleccionados	73
3.2.6 – Purificação dos quatro clones VL anti-gp41 e HR1 Seleccionados	74
3.3 – Ensaio celular de inibição do processo de fusão envelope viral/CD4 pelos VL anti-gp41 e anti-HR1	76
Capítulo 4 – Discussão de resultados	78
4.1 – Construção de bibliotecas <i>naïve</i> de anticorpos VL e selecção dos anticorpos específicos contra a gp41 e HR1 por <i>phage display</i>	79
4.2 – <i>Screening</i> e caracterização dos anticorpos de domínio único seleccionados contra a gp41 e HR1	83
4.3 – Ensaio celular de inibição da fusão envelope viral/CD4 pelos VL anti-gp41 e anti-HR1	86
Capítulo 5 – Conclusão	88
Capítulo 6 – Perspectivas futuras	91
Capítulo 7 – Bibliografia	94

**Capítulo 1**  
**Introdução Teórica**

---

## **1.1 – Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) e Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA)**

### **1.1.1 - Origem e diversidade de VIH/SIDA**

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) representa hoje um dos principais problemas de saúde pública a nível mundial. Esta patologia reflecte a fase final da infecção por VIH, quando o sistema imune do indivíduo infectado se encontra gravemente afectado, perdendo a capacidade de defesa contra agentes estranhos. Esta situação leva, consequentemente, ao surgimento de infecções oportunistas e alguns tipos de cancro<sup>1</sup>.

Etiologicamente, os agentes responsáveis pela SIDA são os Vírus da Imunodeficiência Humana tipo-1 e tipo-2 (VIH-1 e VIH-2), ambos retrovírus pertencentes à família dos lentivírus<sup>2-3</sup>.

VIH-1 foi o primeiro agente a ser isolado em 1983 sendo o principal responsável pela pandemia a nível mundial<sup>4</sup>. Acredita-se que VIH-1 tenha tido origem no Vírus da Imunodeficiência Símia de chimpanzés, denominado VIScpz, tendo sido transmitido dos chimpanzés para os humanos por via sanguínea<sup>5</sup>. VIH-2, identificado posteriormente em 1986, apresenta 40 a 60% de homologia com VIH-1 e propriedades biológicas semelhantes<sup>6-7</sup>. No entanto, difere significativamente em algumas das suas propriedades antigénicas e moleculares, o que o torna o menos virulento dos dois vírus e o responsável por epidemias mais localizadas, nomeadamente nos países da África Ocidental e em alguns Europeus como é o caso de Portugal<sup>2-3</sup>. Acredita-se que VIH-2 tenha tido origem no Vírus da Imunodeficiência Símia de macacos *sooty mangabey*, VISsm, existente na costa ocidental de África, do Senegal à Costa do Marfim<sup>7</sup>.

A análise filogenética de VIH e de outros vírus relacionados, de primatas não humanos, sugere a ocorrência de três transmissões distintas, no início do século XX, dando origem a três grupos de VIH-1: *Major* (M), *Outlier* (O) e *Nonmajor and nonoutlier* (N). O grupo M é o grupo predominante em circulação, responsável por mais de 95% das infecções, a nível mundial. Este grupo está dividido em subtipos, identificados por letras (A-D, F-H, J e K), que por sua vez se encontram divididos em sub-subtipos, identificados por números<sup>5-6, 8</sup> (fig.1).

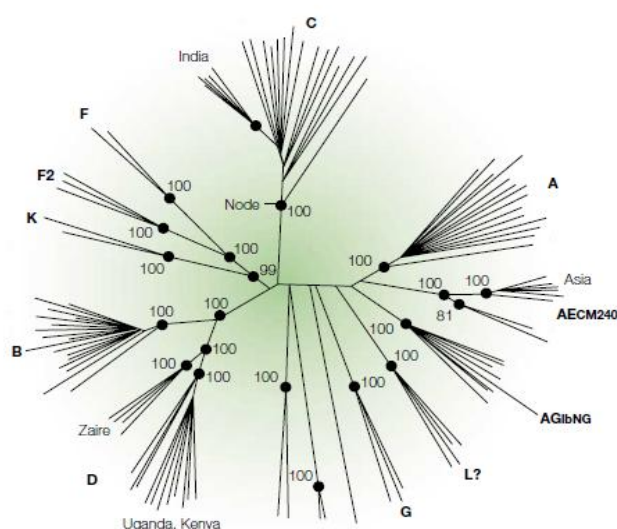


Fig.1 – Relação filogenética dos vários subtipos e das formas recombinantes existentes (adaptado de Robinson<sup>9</sup>).

É notório o elevado grau de diversidade genética de VIH-1. Esta diversidade é responsável pelos vários tipos e subtipos de VIH e pelas formas recombinantes existentes em circulação<sup>6</sup>. A distribuição global dos vários subtipos e das formas recombinantes reflecte a complexidade da epidemiologia molecular de VIH<sup>5</sup>.

Quase trinta anos passados desde a identificação do primeiro caso, a epidemia VIH/SIDA continua a exceder todas as expectativas, tanto ao nível de severidade como da dimensão do impacto socioeconómico<sup>10</sup>. Dados da Organização Mundial de Saúde

(OMS) para 2009 indicaram, a nível mundial, 33,3 milhões de pessoas infectadas, 2,6 milhões de novas infecções e perto de dois milhões de mortes devido ao VIH/SIDA (fig.2).

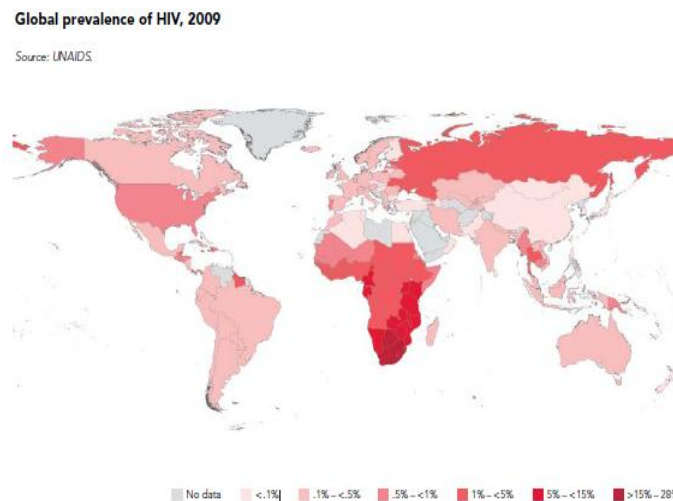


Fig. 2 – Estimativa, a nível mundial, do número de adultos e crianças infectados por VIH em 2009<sup>10</sup>.

O avanço desta epidemia parece ter estabilizado em algumas regiões, continuando a aumentar na Europa Oriental e na Ásia Central. No entanto, a África sub-Sahariana permanece a região mais afectada, com maior número de infecções registadas<sup>10</sup>.

Apesar dos progressos alcançados na prevenção de novas infecções e da diminuição do número de mortes relacionadas com VIH/SIDA, o número de pessoas infectadas continua a crescer. Este aumento é o reflexo do efeito combinado entre a elevada taxa de novas infecções por VIH e o impacto benéfico da terapêutica anti-retrovírica<sup>10</sup>.

### 1.1.2 - Estrutura e organização genômica de VIH-1

VIH pertence à família *Retroviridae* e ao género *Lentivirus*. É um vírus esférico com cerca de 120 nm de diâmetro. É constituído, interiormente, por um núcleo interno, contendo o genoma viral, e enzimas necessárias ao processo de replicação. O núcleo interno encontra-se protegido por uma cápside proteica que, por sua vez, se encontra rodeada por uma membrana lipídica. A matriz viral encontra-se na superfície interna desta membrana. Exteriormente existe uma membrana proteica, também denominada envelope glicoproteico, que representa a superfície exterior do vírus<sup>11-13</sup> (fig.3).

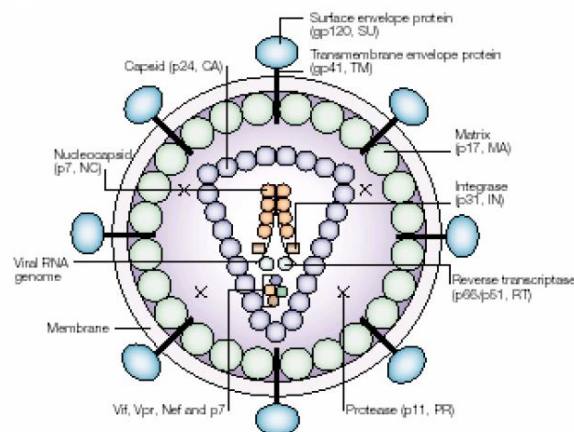


Fig.3 – Representação esquemática da partícula viral VIH (adaptado de Robinson<sup>9</sup>).

O seu genoma é constituído por duas moléculas idênticas de RNA positivas de aproximadamente 9 Kb de comprimento. Cada cadeia codifica 16 proteínas essenciais ao ciclo de replicação do vírus. Algumas destas proteínas são componentes estruturais e enzimáticos comuns a todos os retrovírus<sup>14</sup>. O vírus utiliza processos complexos, quer na produção quer na clivagem do RNA mensageiro (mRNA) e de polipéptidos, de modo a produzir as proteínas necessárias à sua replicação dentro da célula hospedeira<sup>15</sup>.

De um modo geral, as proteínas essenciais à infecção e replicação de VIH derivam de três genes principais sendo eles *gag* (*group-specific antigen*), *pol*



(*polymerase*) e *env* (*envelope*) que codificam para as proteínas Gag, Pol e Env respectivamente. Estas são, posteriormente, processadas proteoliticamente dando origem aos vários componentes da partícula viral<sup>14, 16</sup> (fig.4).

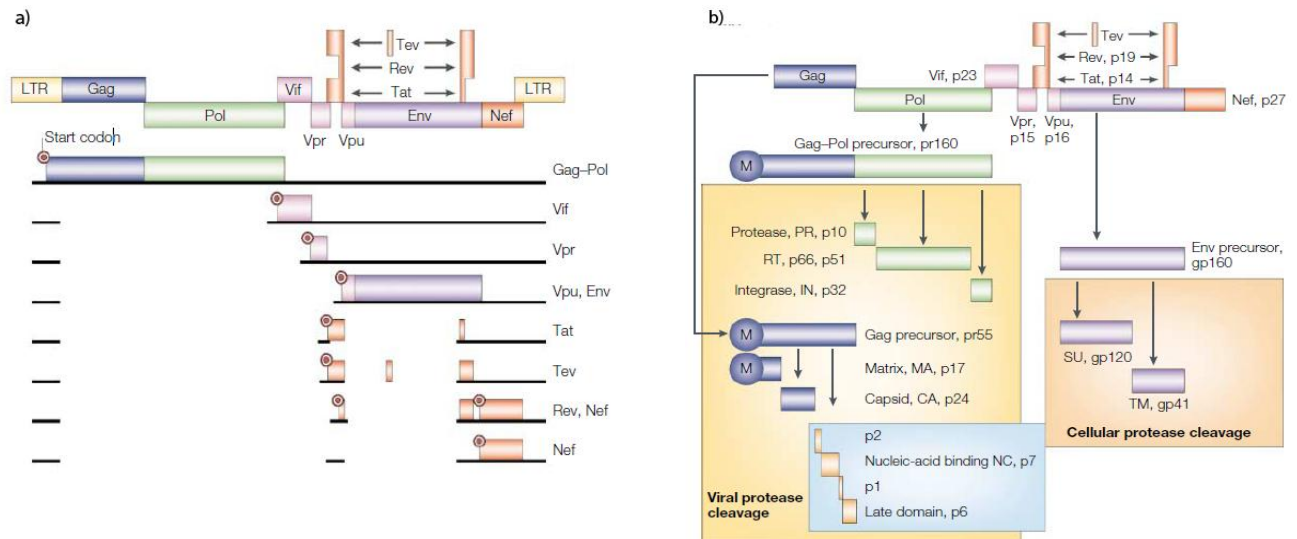


Fig.4 – Representação do genoma e proteoma de VIH-1; a) representação da organização dos genes que codificam para as proteínas essenciais de VIH-1; b) proteínas virais obtidas após processo proteolítico (adaptado de Peterlin *et al*<sup>16</sup>).

A proteína de fusão GagPol é, num passo inicial, clivada proteoliticamente por uma protease viral originando os polipéptidos Gag e Pol<sup>15</sup>. A proteína Gag, por sua vez, é clivada, dando origem às três proteínas estruturais: matriz ou p17 (MA), cápside ou p24 (CA), nucleocápside ou p7 (NC)<sup>14, 17</sup>. O processamento proteolítico da proteína Pol dá origem a enzimas essenciais à replicação viral sendo estas a protease ou p10 (PR), transcriptase reversa ou p50 (RT), integrase ou p31 (IN) e RNase H ou p15<sup>14-15, 17-18</sup>. A proteólise da proteína Env (gp160) origina duas proteínas essenciais à infecção: a proteína de superfície ou gp120 (SU) e a transmembranar ou gp41 (TM), ambas constituintes do envelope viral<sup>14, 17</sup>. A gp120 é uma proteína extracelular cuja principal função é o reconhecimento de receptores das células hospedeiras essenciais à infecção,

como o CD4 e o CCR5/CXCR4. No que se refere à gp41 esta é uma proteína transmembranar, responsável pela fusão das membranas viral e celular<sup>13</sup>.

O genoma de VIH-1 codifica, também, seis proteínas adicionais, denominadas de acessórias. Três destas proteínas, Vif (*Virion Infectivity Factor*), Vpr (*Viral Protein Regulatory*) e Nef (*Negative factor*), são constituintes da partícula viral e consideradas proteínas multifuncionais. A Nef tem a capacidade de desregular a activação das células T e de estimular a infecciosidade viral, a Vpr participa no transporte do DNA viral do citoplasma para o núcleo e a Vif aumenta a infecciosidade viral<sup>13-14</sup>. As duas outras proteínas acessórias, Tat (*Transcriptional transactivator*) e Rev (*Regulator of virion expression*), apresentam função reguladora. A Tat actua como activador transcripcional e a Rev regula a expressão de proteínas virais<sup>13-14, 16</sup>. Por último, a proteína Vpu (*Viral protein U*) participa no processo de libertação de novas partículas virais<sup>13-14</sup>.

Existem, ainda, duas regiões localizadas nas extremidades do genoma viral denominadas *Long Terminal Repeats* (LTRs) cuja actividade regula a expressão do genoma viral.

### **1.1.3 - Ciclo de replicação de VIH-1**

O ciclo de replicação de VIH-1 é caracterizado pela existência de duas fases: a fase inicial e fase tardia<sup>19-20</sup>.

A fase inicial é iniciada com o reconhecimento das células alvo por parte dos viriões e engloba todo o processo de entrada e integração do DNA viral no genoma da célula<sup>19-20</sup>. A entrada do vírus na célula ocorre mediante a fusão das membranas viral e celular, processo mediado pelas duas glicoproteínas existentes no envelope viral:

gp120 e gp41<sup>11</sup>. A subunidade gp120 liga-se ao receptor celular CD4. Esta ligação induz alterações conformacionais no envelope glicoproteico expondo um domínio altamente conservado, anteriormente inacessível, que se liga a um co-receptor (por exemplo CCR5 ou CXCR4). A ligação ao co-receptor induz, por sua vez, alterações conformacionais ao nível da subunidade gp41. Este processo resulta na fusão das membranas viral e celular<sup>21</sup>.

Após a fusão, o conteúdo da partícula viral, constituído principalmente pelo RNA genómico e por enzimas (transcriptase reversa, integrase e protease), é libertado para o citoplasma da célula. De seguida, a enzima transcriptase reversa catalisa o processo de transcrição do RNA numa cópia de DNA, a qual é, posteriormente, transportada para o núcleo (fig.5).

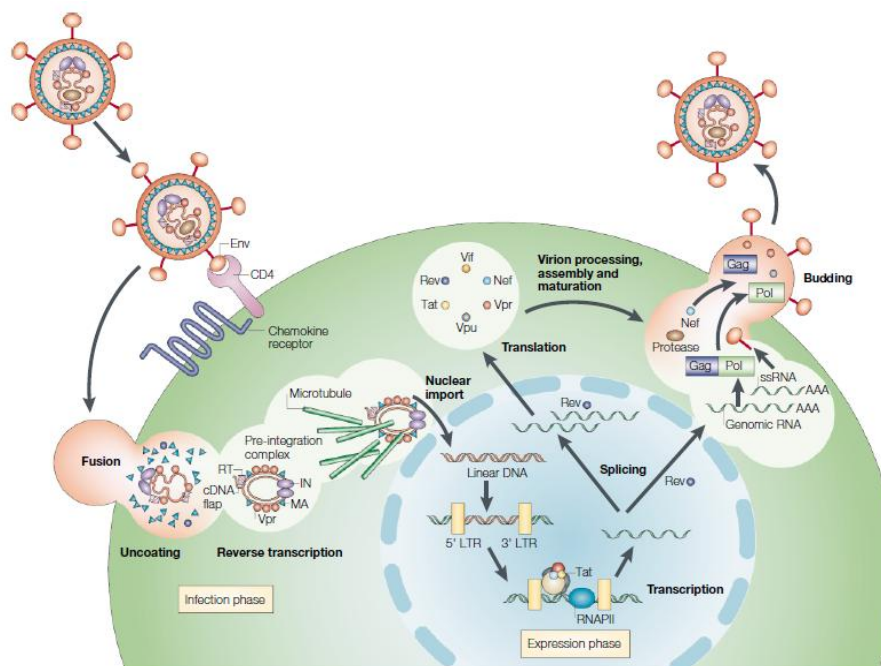


Fig. 5 – Representação esquemática do ciclo de replicação de VIH-1<sup>16</sup>.

Uma vez no núcleo, o DNA é integrado no genoma da célula por intermédio da enzima viral integrase, originando um provírus<sup>20, 22</sup>. A partir do provírus integrado é possível sintetizar os mRNAs que codificam para proteínas estruturais, reguladoras e

acessórias, necessárias à replicação viral<sup>19</sup>. Depois de integrado, o DNA viral permanece continuamente associado ao material genético da célula hospedeira ou seja, a informação genética viral passa a fazer parte integrante do genoma da célula, podendo permanecer neste estadio durante algum tempo sem que haja a produção de novas partículas virais<sup>11</sup>.

A fase tardia tem início com a síntese de mRNA que é, posteriormente, transportado para o citoplasma<sup>20</sup>. Como resultado do metabolismo natural da célula hospedeira, o DNA, contendo o genoma viral, é transcrito, processo este catalisado pela enzima celular RNA polimerase II<sup>22</sup>. O processo de transcrição origina um pré-mRNA policistrónico que contém múltiplos locais de *splicing*. A totalidade de RNA transcrito é utilizado em dois processos distintos. Uma parte sofre o processo de *splicing* e é utilizado para a codificação de proteínas estruturais e enzimáticas necessárias à replicação viral. O restante RNA não sofre *splicing* e é transportado para o citoplasma vindo a constituir, posteriormente, o material genético das futuras partículas virais após o processo de encapsidação<sup>23</sup> (fig.5).

Uma vez sintetizadas as proteínas necessárias à replicação viral, inicia-se o processo de formação de novos viriões. O precursor poliproteico Gag desempenha um papel determinante uma vez que contém regiões que permitem a migração para a membrana plasmática e ligação à mesma, promoção da interacção Gag-Gag, a encapsidação do RNA viral, a associação com a glicoproteína viral Env e a promoção da saída dos viriões formados *de novo*<sup>19</sup>.

Após a libertação das partículas virais formadas e imaturas, estas sofrem um processo de maturação em que a proteína viral protease cliva os precursores Gag e GagPol originando viriões infecciosos<sup>19</sup>.

## 1.2 - VIH e terapêutica anti-retrovírica

A terapêutica anti-retrovírica tem-se mostrado de extrema importância no combate à infecção por VIH/SIDA. O desenvolvimento de novos fármacos proporciona, cada vez mais, opções de tratamento e qualidade de vida aos indivíduos infectados<sup>22</sup>.

Em Março de 1987, a molécula zidovudina tornou-se o primeiro anti-retrovírico a ser aprovado para o tratamento de VIH/SIDA<sup>24</sup>. A ele seguiram-se didanosina e zalcitabina. Estes são inibidores da enzima transcriptase reversa e têm como objectivo impedir a replicação viral dentro da célula hospedeira<sup>25</sup>. O aparecimento destas três moléculas alterou de forma positiva a progressão da doença<sup>25</sup>. Após cerca de 20 anos o número de compostos licenciados para uso clínico aumentou para 25<sup>24</sup>.

As moléculas utilizadas na terapêutica anti-retrovírica estão agrupadas segundo os seus alvos, podendo estes ser de origem enzimática ou celular<sup>22</sup>. Têm como objectivo bloquear passos específicos do ciclo de replicação viral. Estas moléculas são classificadas como inibidores de entrada, inibidores da transcriptase reversa (nucleósidos e não nucleósidos), inibidores da integrase e inibidores da protease<sup>24</sup>.

A maior parte das moléculas licenciadas são inibidores da transcriptase reversa ou da protease, moléculas estas que constituem a base da terapêutica anti-retrovírica combinada (TARc) (do inglês *Highly Active Antiretroviral Therapy* (HAART))<sup>24</sup>. A terapêutica TARc baseia-se na combinação de um ou dois inibidores nucleósidos da transcriptase reversa, um não nucleósido e/ou um inibidor da protease. Esta forma de terapia tornou-se um procedimento frequente no combate à infecção por VIH estando a proporcionar, cada vez mais, uma maior qualidade de vida aos indivíduos infectados e uma significativa diminuição da mortalidade associada a esta patologia<sup>24, 26</sup>.

O que se pretende com qualquer esquema de terapêutica anti-retrovírica é a diminuição continuada da virémia no plasma, o que permite preservar o número de células T CD4<sup>+</sup>. No entanto, a terapia aplicada hoje em dia não permite a eliminação completa do vírus do organismo. Deste modo, a toma da medicação deve ser mantida toda a vida<sup>27</sup>.

Apesar do enorme sucesso da terapêutica anti-retrovírica aplicada, existem alguns problemas que afectam o êxito dos esquemas terapêuticos. Um dos factores é a adesão ao tratamento. Uma vez iniciada a terapêutica, esta deve ser contínua, sem interrupções, e prolongada. Verifica-se que a adesão baixa quanto maior for o número de comprimidos a tomar e quanto maior for o número de tomas por dia. Outro dos factores, que também está relacionado com a adesão ao tratamento, é a existência de efeitos secundários aos medicamentos. Apesar de serem notórios os benefícios da terapêutica TARc, a toxicidade associada existe e afecta significativamente a qualidade de vida dos indivíduos infectados<sup>27-28</sup>.

Outro dos problemas associados à terapêutica TARc é o desenvolvimento de resistências virais aos fármacos utilizados<sup>28</sup>. A redução da carga viral no plasma não implica a eliminação do vírus nos reservatórios naturais e não previne a replicação de vírus activos *in vivo*. A incompleta supressão da replicação do vírus leva ao inevitável aparecimento de resistências<sup>29</sup>. Também a toma de compostos anti-retrovíricos em concentrações inapropriadas exerce pressão selectiva positiva, seleccionando estirpes resistentes<sup>30</sup>.

A emergência de multirresistências do vírus à terapêutica utilizada tem implicações clínicas significativas<sup>24</sup>. Este aspecto é muito importante na medida em que a susceptibilidade aos fármacos diminui, reduzindo, progressivamente, a eficácia das combinações terapêuticas usadas. A percentagem de novos indivíduos infectados por

VIH, que possuem vírus resistentes a pelo menos uma medicação anti-retrovírica tem vindo a aumentar. Deste modo, a erradicação total de VIH parece impossível com as actuais estratégias terapêuticas. Novas terapias e outros alvos mais promissores precisam surgir rapidamente, com o objectivo de bloquear outros passos do ciclo de replicação do vírus e combater as formas mais resistentes de VIH que já circulam pelo mundo<sup>24</sup>.

O aumento do conhecimento sobre o processo de entrada do vírus nas células, bem como o dos seus intervenientes, veio ajudar na descoberta e desenho de novas moléculas capazes de inibir o processo de infecção<sup>31</sup>. Os inibidores de entrada representam, portanto, uma nova abordagem na prevenção e terapêutica anti-retrovírica<sup>30-31</sup>.

### **1.2.1 Inibidores de entrada**

O processo de entrada do vírus na célula hospedeira é um passo essencial na infecção<sup>30</sup>. Uma vez que existe um número considerável de moléculas envolvidas no processo de entrada, as moléculas intervenientes, tanto de origem viral como celular, são potenciais alvos terapêuticos<sup>31</sup>.

Enquanto os inibidores da transcriptase reversa, integrase e protease têm como objectivo a interrupção do processo de replicação viral, quando o vírus já se encontra no interior da célula hospedeira, os inibidores de entrada visam a interrupção da infecção e da entrada do vírus, de maneira a que a infecção não se estabeleça<sup>31</sup>.

Uma vez que cada passo do mecanismo de entrada do vírus na célula é um potencial alvo para moléculas anti-retrovíricas, os inibidores de entrada são

classificados em inibidores da ligação CD4-gp120, inibidores da ligação gp120 ao co-receptor (por exemplo CXCR4 ou CCR5) e inibidores da fusão<sup>30</sup>.

Os inibidores da ligação CD4-gp120 têm como objectivo impedir o primeiro passo do processo de entrada do vírus na célula, ou seja, a ligação entre a glicoproteína viral gp120 e o receptor celular CD4<sup>32</sup>. Uma série de diferentes moléculas, com diferentes mecanismos de acção, têm sido estudadas<sup>30</sup>. O PRO-542 é uma proteína de fusão em que o local de ligação à gp120 da estrutura tetramérica do receptor CD4 se encontra ligado à região constante de uma imunoglobulina, tendo como objectivo simular o receptor CD4<sup>30-32</sup>. Existe, também o TNX-355, que consiste apenas num anticorpo monoclonal contra o receptor CD4<sup>30</sup>. Outras moléculas mais pequenas têm sido alvo de estudo como a BMS-378806 e BMS-488043 que se ligam à gp120, interferindo com a ligação ao receptor CD4<sup>30, 32</sup>. Até ao momento nenhum destes compostos chegou à clínica apesar de estarem a decorrer estudos *in vivo*<sup>30</sup>.

Os inibidores da ligação da gp120-co-receptores permitem interromper a ligação entre a proteína viral gp120 e os co-receptores celulares. Estas moléculas actuam ao nível do co-receptor celular e não ao nível da partícula viral<sup>30</sup>. Até ao presente, apenas um inibidor de ligação ao co-receptor foi aprovado para uso clínico, a molécula imidazopiridina ou UK107,543<sup>33</sup>. É comercializado com o nome de *Maraviroc* e impede a ligação gp120-CCR5, pela ligação ao co-receptor<sup>30</sup>. A utilização desta molécula traz um problema. Estas moléculas apenas bloqueiam a ligação ao CCR5, ficando outros co-receptores disponíveis para a ligação a outras partículas virais. Tal facto induz uma pressão selectiva positiva favorecendo as partículas virais que apresentam tropismo para outros co-receptores<sup>30</sup>.

Os inibidores de fusão incidem a sua acção sobre a proteína viral gp41 nomeadamente sobre os estados intermediários originados aquando das alterações



conformacionais resultantes do processo de entrada<sup>32</sup>. Este assunto será abordado com maior detalhe no próximo tema.

### 1.3 – A glicoproteína gp41: um ponto-chave no processo de fusão

#### 1.3.1 – Estrutura e importância da gp41

VIH-1 introduz o seu material genético nas células alvo após a fusão do seu envelope lipídico com a membrana plasmática da célula. Este processo é mediado por uma glicoproteína que se encontra ancorada ao envelope viral por um domínio transmembranar (TM) denominada gp41 (fig.6). Associada à gp41 encontra-se a glicoproteína gp120 (fig.6), uma proteína de superfície (SU), responsável pelo início do processo de fusão<sup>34</sup>. As duas subunidades gp120 e gp41 estão associadas não covalentemente<sup>35</sup>.

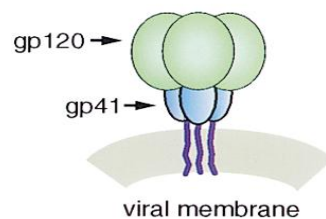


Fig.6 – Representação esquemática da localização e estrutura conformacional das glicoproteínas gp120 e gp41 na membrana viral de VIH-1 (adaptado de Chan *et al*<sup>36</sup>).

A gp41 desempenha um papel fundamental no processo de fusão e entrada do vírus na célula hospedeira. É uma proteína com regiões conservadas (apresenta menor variabilidade que a gp120) e é constituída por 345 aminoácidos com um peso molecular de 41 KDa. Apresenta-se como uma estrutura trimérica, constituída pelos seguintes domínios: uma região conservada extracelular denominada de ectodomínio ou e-gp41 (fig.7; do aminoácido 512 a 684), um domínio transmembranar (TM) (fig.7; entre os

aminoácidos 684 e 705) e um domínio no terminal carboxílico (C) (fig.7; entre os aminoácidos 705 e 856)<sup>37</sup>.

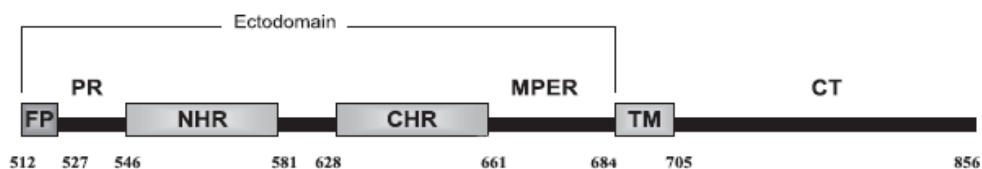


Fig.7 - Representação esquemática dos domínios constituintes da proteína gp41 (adaptado de Montero *et al*<sup>37</sup>).

O ectodomínio é fundamental no processo de fusão e é constituído por regiões determinantes para todo o processo sendo elas a região hidrofóbica N-terminal que funciona como péptido de fusão (FP; entre os aminoácidos 512 e 527), uma região polar (PR; do 525 ao 543) seguida de duas regiões helicais repetidas denominadas de *N-terminal Heptad Repeat* (NHR; do 546 ao 581) e *C-terminal Heptad Repeat* (CHR; do 628 ao 661) interligadas e, por fim, uma região rica em triptofano denominada *Membrane Proximal Ectodomain Region* (MPER; do 660 ao 683)<sup>32, 37</sup>.

O péptido de fusão é uma região hidrofóbica que actua promovendo a desestabilização membranar através da sua inserção oblíqua na membrana da célula, promovendo o processo de fusão. O seu estado não fusogénico encontra-se inacessível no complexo quaternário gp120/gp41 ficando exposto, única e transitoriamente, para interacções membranares após a ligação da gp120 ao receptor CD4<sup>37</sup>.

As regiões NHR (também denominada HR1) e CHR (denominada HR2) são outro ponto-chave no processo de fusão. Estes domínios sofrem alterações conformacionais que resultam na formação de uma segunda estrutura que permite a aproximação das membranas viral e celular, permitindo a formação de um poro, levando, consequentemente, à entrada da nucleocápside para o interior da célula<sup>34, 37</sup>.

A região MPER pertence ao domínio C-terminal do ectodomínio da gp41. É uma região altamente conservada. Desempenha um papel fundamental no processo de fusão mas não se sabe ao certo o seu modo de actuação. Esta proteína contém inúmeros aminoácidos hidrofóbicos e é rica em triptofano. Sabe-se que a substituição de alguns destes aminoácidos altera drasticamente a eficiência de entrada do vírus na célula hospedeira<sup>37-38</sup>.

### **1.3.2 – A função da gp41 no processo de fusão**

O acesso à gp41 requer alterações conformacionais no complexo gp120/gp41 que são promovidas pela ligação da gp120 ao receptor da célula alvo (CD4) e aos coreceptores. Estas alterações desencadeiam o processo de fusão<sup>34</sup>. De um modo geral, no estado conformacional fusogénico da gp41, as estruturas helicais dos terminais amina e carboxílico do ectodomínio interagem uma com a outra, adoptando uma conformação antiparalela. Esta alteração facilita a justaposição das membranas viral e celular, levando à fusão das mesmas<sup>31</sup>.

De um modo mais específico, a ligação sequencial da gp120 ao receptor celular promove alterações conformacionais ao nível da gp41, a qual adopta uma conformação denominada estado intermediário de *pre-hairpin*. Esta alteração leva à inserção do péptido de fusão, localizado na região hidrofóbica N-terminal, na membrana da célula alvo. Consequentemente, as duas regiões helicais HR1 e HR2 interagem entre si, emparelhando paralelamente, de forma a adoptar uma conformação antiparalela denominada *six-Helix Bundle* (6HB)<sup>35, 39-40</sup>. A transição do estado intermediário de *pre-*

*hairpin* para a estrutura estável 6HB faz com que as duas membranas, viral e celular, se aproximem, permitindo a fusão<sup>35</sup> (fig.8).

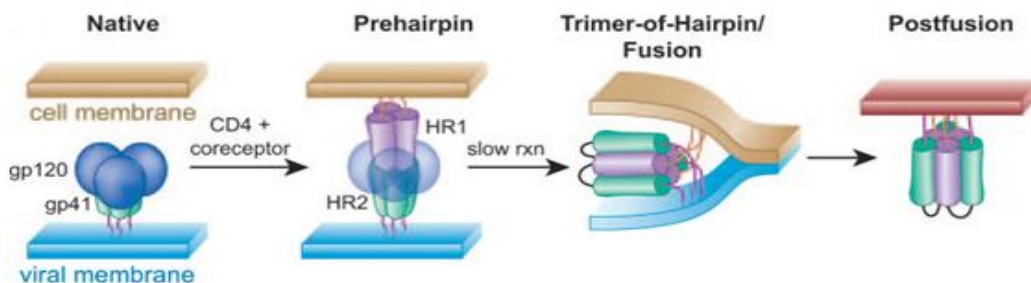


Fig.8 – Esquema representativo do processo de fusão da membrana viral de VIH-1 com a membrana plasmática da célula alvo (adaptado de Miller *et al*<sup>40</sup>).

Por serem domínios conservados e de carácter transitório, os estados conformacionais intermediários da gp41, no processo de fusão, são alvos promissores para a terapêutica anti-VIH-1, nomeadamente, para a inibição da fusão das membranas viral e celular, durante o processo de entrada e infecção.

### 1.3.3 - A proteína gp41 de VIH-1 como alvo terapêutico

Desde a década passada que se tem vindo a observar que moléculas inibidoras do processo de fusão se mostram eficientes na interrupção da entrada do vírus na célula. Estas moléculas ligam-se a regiões da gp41, impedindo as alterações conformacionais requeridas para o sucesso do processo de entrada sendo, portanto, denominados de inibidores de fusão<sup>41</sup>.

Existem três classes de inibidores de fusão, cujo mecanismo de acção se centra na ligação ao estado intermediário de *pre-hairpin* sendo estes os inibidores de classe 1,

que têm como alvo a região N-terminal do ectodomínio da gp41 (HR1) (fig.9), inibidores de classe 2, que actuam ao nível da região C-terminal do ectodomínio (HR2) (fig.9), e inibidores de classe 3 que promovem a disrupção da estrutura trimérica da região NHR<sup>41</sup>.

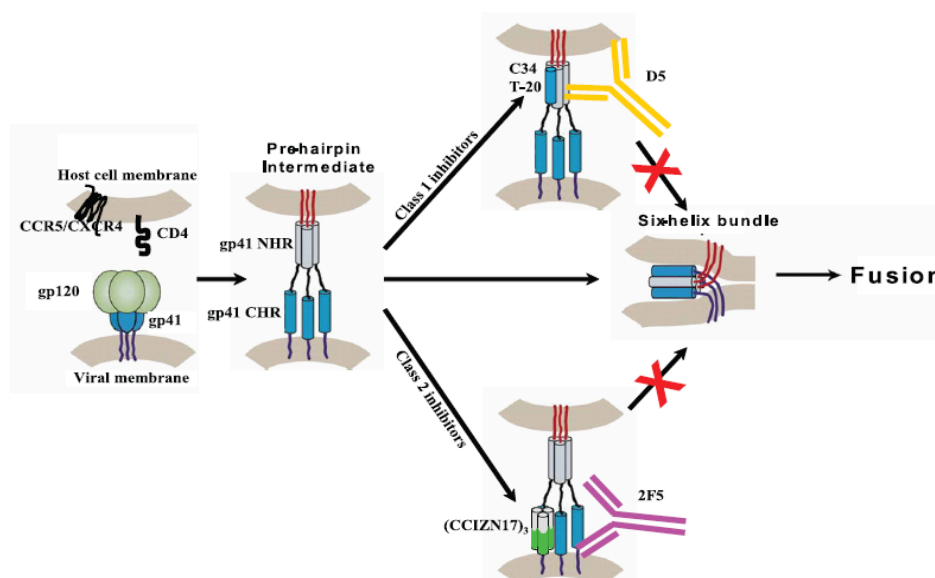


Fig.9 – Esquema representativo do local e modo de acção das classes 1 e 2 de inibidores de fusão (adaptado de Hrin *et al*<sup>41</sup>).

No que diz respeito aos inibidores de fusão de classe 1, estes são compostos que inviabilizam a continuidade do processo de fusão ao se ligarem à região NHR. A molécula melhor caracterizada é o péptido T-20, também conhecido como DP178 ou *enfuvirtide*, e é comercializado com o nome de Fuzeon<sup>41</sup>. Até ao momento, é o único inibidor de fusão licenciado pela *Food and Drug Administration* (FDA)<sup>42</sup>. Este fármaco é um péptido sintético idêntico a uma sequência de 36 aminoácidos do domínio C-terminal da proteína gp41 que se liga à região NHR após alteração conformacional, impedindo a aproximação das proteínas víricas com a membrana da célula hospedeira (fig.9)<sup>42</sup>. Apesar de se apresentar como uma molécula capaz de interromper o processo de fusão viral, apresenta algumas desvantagens, importantes de referir. Por um lado, a

administração prolongada do T-20 conduz ao desenvolvimento de resistências. Por outro, o custo do processo de produção do T-20 é elevado e o seu modo de administração não é prático, consistindo o tratamento diário em duas injeções subcutâneas<sup>30</sup>.

Encontra-se, também, descrito um anticorpo monoclonal como inibidor de fusão de classe 1. É denominado de D5 e liga-se exclusivamente à região hidrofóbica formada pelo trímero NHR (fig.9)<sup>41</sup>. É o único anticorpo monoclonal inibidor de fusão classe 1 bem estudado e caracterizado, descrito até hoje<sup>41</sup>.

Os inibidores de fusão de classe 2 têm como alvo a região CHR. São exemplos destes compostos alguns péptidos quiméricos tais como o IZN17 e IZN36. No que diz respeito a anticorpos, não existe nenhum identificado que se ligue especificamente à região CHR. No entanto, existem alguns anticorpos descritos que se ligam a uma região adjacente à região CHR, que codifica para a proteína MPER<sup>41</sup>. São denominados de 2F5, 4E10 e Z13 e todos eles reconhecem epítomos distintos formados por resíduos aminoacídicos da região C-terminal e da MPER<sup>41, 43</sup>, sendo o 2F5 o anticorpo melhor caracterizado de entre os três mencionados (fig.9)<sup>41</sup>. No entanto, estudos revelam que estes anticorpos apenas reconhecem o péptido isoladamente, sendo incapazes de se ligarem à estrutura trimérica da MPER no seu estado conformacional, no processo fusogénico<sup>43</sup>.

Os inibidores de fusão de classe 3, como é o caso do péptido N36<sub>Mut</sub>, actuam ao nível da região NHR promovendo, consequentemente, a disrupção da estrutura conformacional trimérica da região NHR<sup>41</sup>.

A investigação tem continuado no sentido de se encontrarem moléculas mais pequenas capazes de inibirem o processo de fusão, ou melhorar péptidos já existentes, aumentando a biodisponibilidade e reduzindo custos de produção. Os anticorpos de

menores dimensões encontram-se entre estas moléculas, numa tentativa de alcançarem alvos não acessíveis aos anticorpos monoclonais<sup>30</sup>. O trabalho desenvolvido neste projecto vem ao encontro desta temática, tendo como objectivo obter e caracterizar anticorpos de domínio único contra uma das proteínas mais importantes no processo de fusão, a gp41.



## **1. 4 – Anticorpos monoclonais e anticorpos de domínio único**

### **1.4.1 – Sistema imunitário e resposta humoral**

O sistema imunitário é um processo de defesa notável e versátil que protege o organismo dos vertebrados de agentes patogénicos invasores e de tumores. Este sistema, no seu todo, é capaz de gerar uma enorme variedade de células e moléculas capazes de reconhecer e eliminar, de modo específico, uma quantidade infindável de agentes patogénicos<sup>44</sup>.

Existem dois tipos diferentes de resposta imunitária: inata e adquirida.

A imunidade inata representa a primeira linha de defesa na qual a maior parte dos seus intervenientes está presente antes da infecção. Constitui, portanto, um conjunto de mecanismos de defesa de baixa especificidade<sup>44-45</sup>.

A imunidade adquirida é caracterizada pela elevada especificidade, diversidade, memória imunológica e reconhecimento do “próprio” e do “não próprio”. É activada unicamente após o contacto com o antígeno. A resposta adquirida envolve a proliferação de células T (resposta celular) e B (resposta humoral), processo este desencadeado pela ligação do antígeno aos receptores celulares<sup>44</sup>.

A resposta celular é mediada pelos linfócitos T. Estas células expressam à sua superfície receptores específicos, capazes de reconhecer antígenos e desencadear a resposta imunitária. No entanto, estes receptores não reconhecem as moléculas no seu todo, apenas reconhecem os antígenos expostos pelos complexos MHC (*Major Histocompatibility Complex*) existentes à superfície de células apresentadoras de antígeno. Quando os receptores dos linfócitos T se ligam aos antígenos expostos nos complexos MHC verifica-se a proliferação e diferenciação destas células T originando células efectoras e de memória que medeiam a resposta celular<sup>44</sup>.

A resposta humoral tem como base a acção de anticorpos. Neste tipo de resposta, o sistema imunitário actua sobre cada antígeno pela produção de anticorpos específicos. De um modo mais específico, o antígeno, ao entrar no organismo, liga-se a receptores existentes à superfície de células estimulando uma fracção de linfócitos B geneticamente específicos para estas moléculas. Verifica-se uma rápida proliferação e diferenciação destes linfócitos B que leva à produção e libertação para o plasma de anticorpos altamente específicos<sup>44</sup>.

#### **1.4.2 - Características e propriedades dos anticorpos**

Os anticorpos, também denominados imunoglobulinas, são glicoproteínas multifuncionais, de elevada massa molecular. Existem em abundância no soro dos animais vertebrados e são responsáveis pela defesa do organismo contra toxinas e agentes patogénicos<sup>44</sup>.

Um anticorpo convencional apresenta uma estrutura tetramérica, constituída por quatro cadeias polipeptídicas sendo estas duas cadeias leves (L) e duas cadeias pesadas (H). As cadeias leves apresentam um peso molecular de 25 KDa enquanto as cadeias pesadas têm um peso molecular que varia entre os 50 e 70 KDa<sup>44</sup>. As quatro cadeias estão conectadas entre si por ligações covalentes e não covalentes que proporcionam uma estrutura tridimensional em forma de “Y”, de aproximadamente 150 KDa, com os locais de ligação ao antígeno nos terminais amina de cada cadeia<sup>44, 46-47</sup> (fig.10).

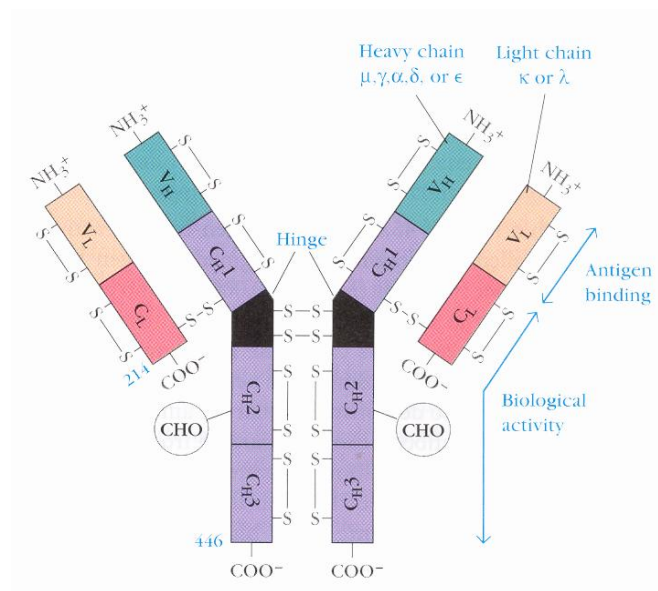


Fig.10 – Esquema representativo da estrutura de um anticorpo com realce das regiões variáveis e constantes das cadeias leve e pesada<sup>44</sup>.

Cada “braço” da estrutura contém uma cadeia leve completa e a extremidade N-terminal da cadeia pesada enquanto que a “base” é constituída unicamente pelas regiões C-terminal das duas cadeias pesadas<sup>44</sup>.

Os anticorpos apresentam regiões variáveis nas extremidades N-terminal e regiões constantes na extremidade C-terminal. As cadeias leves são constituídas por um domínio variável (VL) e um constante (CL) enquanto as pesadas têm um domínio variável (VH) e três ou quatro domínios constantes (CH1, CH2, CH3) (fig.10), dependendo da classe do anticorpo<sup>44</sup>.

As regiões variáveis de ambas as cadeias são responsáveis pelo reconhecimento e ligação ao antígeno. São constituídas por três sub-regiões hipervariáveis denominadas *Complementarity Determining Regions* (CDR1, CDR2 e CDR3), interligadas entre si por três sub-regiões conservadas denominadas *frameworks*. A conformação estereoquímica criada pela combinação das sequências hipervariáveis das cadeias leves e pesadas determina a especificidade do anticorpo<sup>44</sup>.

Os anticorpos desempenham um papel central no processo de defesa, ajudando na eliminação do antígeno. Estas moléculas actuam como conectores, fazendo a ligação entre o reconhecimento dos agentes estranhos ao organismo e os mecanismos efectores não específicos como citotoxicidade dependente de anticorpos, activação do complemento e fagocitose<sup>46</sup>. Uma das suas funções é a aglutinação, processo caracterizado pela formação de complexos insolúveis de antígeno/anticorpo, tornando mais fácil a sua eliminação por células do sistema imunitário. Outra das funções é a intensificação da fagocitose. A combinação antígeno/anticorpo aumenta a acção das células fagocitárias, promovendo a endocitose. Os anticorpos contribuem, também, para a activação do sistema do complemento e actuam directamente na neutralização de vírus e toxinas<sup>44</sup>.

Desde cedo que os anticorpos vêm despertando a atenção da indústria farmacêutica uma vez que apresentam elevada afinidade e especificidade para a molécula alvo<sup>48</sup>. Os anticorpos rapidamente se tornaram uma importante classe de moléculas utilizadas na terapêutica. Mais de 25 anticorpos foram aprovados pela FDA para terapia e mais de 240 encontram-se actualmente em ensaios clínicos, direccionados para uma vasta gama de patologias, incluindo autoimunidade e inflamação, cancro, transplantação de órgãos, doenças cardiovasculares, infecciosas e oftalmológicas<sup>49</sup> e também, doenças raras<sup>50</sup>.

No entanto, o tamanho de um anticorpo convencional não é por vezes compatível com a eficácia. Existem problemas de difusão e penetração em tecidos aquando do processo de ligação ao antígeno, nomeadamente no caso de tumores sólidos<sup>46</sup>. Avanços em engenharia genética em conjugação com as propriedades únicas dos anticorpos permitiu a sua manipulação molecular, promovendo o aparecimento de moléculas recombinantes e fragmentos de anticorpos<sup>51</sup>. A investigação tem evoluído no

sentido de obter fragmentos funcionais de anticorpos cada vez mais pequenos, levando à expansão da terapêutica envolvendo anticorpos e ao consequente aparecimento de novos alvos terapêuticos<sup>46, 52</sup>.

### 1.4.3 – Fragmentos de anticorpos recombinantes

Os domínios constituintes dos anticorpos monoclonais podem ser separados entre si, obtendo-se fragmentos de anticorpos, de diferentes dimensões, que mantêm a sua funcionalidade de origem.

Inicialmente, os fragmentos eram obtidos por clivagem proteolítica nas proximidades das pontes dissulfureto. A acção da papaína e pepsina, que clivavam o anticorpo em locais específicos, originavam os fragmentos Fab (*Fragment antigen binding*) e Fab<sub>2</sub> respectivamente. Hoje em dia, os fragmentos de anticorpos são obtidos por engenharia genética originando, não só os Fab como, também, outros fragmentos monovalentes como os scFv (*single-chain variable fragment*) e os anticorpos de domínio único VH e VL (fig.11). Surgiram, além dos fragmentos monovalentes, os divalentes como são exemplo os Fab<sub>2</sub>, os *minibodies*, *diabodies*, entre outros<sup>47</sup> (fig.11).

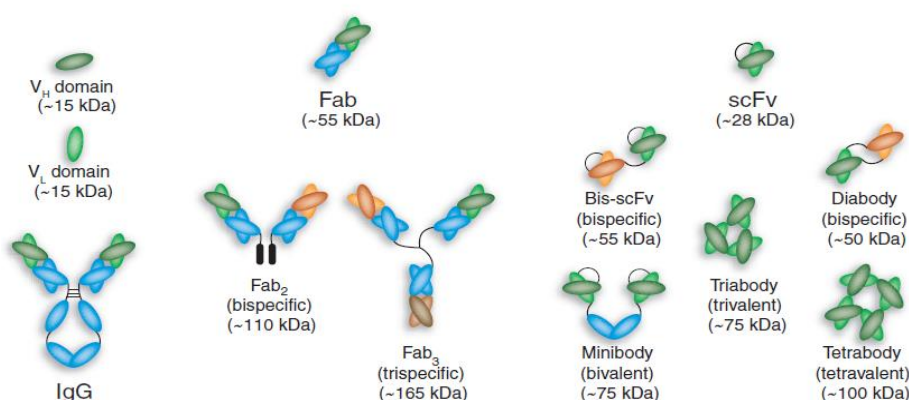


Fig.11 – Exemplos de fragmentos de anticorpos (adaptado de Holliger *et al*<sup>47</sup>).

Os fragmentos Fab são constituídos pela cadeia leve completa e dois domínios correspondentes aos terminais amina das cadeias pesadas (VH e CH1) enquanto os fragmentos Fab2 são compostos por dois fragmentos Fab ligados por pontes dissulfureto. Os fragmentos scFv são constituídos por um domínio VH e um VL ligados por um pequeno péptido flexível. Estes fragmentos de anticorpos, por apresentarem os domínios VH e VL de ligação ao antígeno, retêm a especificidade e afinidade do anticorpo que lhes deu origem<sup>47</sup>.

Os fragmentos de anticorpos apresentam inúmeras vantagens em relação a um anticorpo convencional. Além de manterem a mesma especificidade para a molécula alvo, os custos associados à sua produção são menores e possuem características únicas, como as suas reduzidas dimensões e facilidade de expressão, que permitem a sua aplicação tanto em termos de diagnóstico como de terapêutica<sup>47, 53</sup>. Nos últimos anos, a biologia molecular tem apresentado progressos significativos, tendo vindo a proporcionar cada vez mais a manipulação e clonagem de fragmentos de anticorpos. Estes fragmentos têm demonstrado ser alternativas aos anticorpos convencionais<sup>47, 53</sup>.

#### **1.4.4 – Anticorpos de domínio único**

Os anticorpos de domínio único (sdAb) são fragmentos monoméricos de anticorpos que consistem apenas nas regiões variáveis das cadeias leves (VL) ou pesadas (VH) constituintes de um anticorpo como uma IgG. Apresentam dimensões reduzidas ( $\approx 15$  KDa) comparativamente ao anticorpo inteiro ( $\approx 150$  KDa)<sup>48</sup> (fig.12).

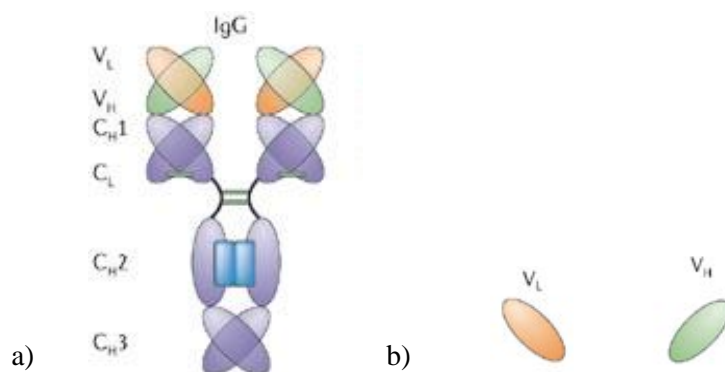


Fig.12 – Representação esquemática de sdAb; a) anticorpo convencional (IgG); b) anticorpos de domínio único VL e VH (adaptado de Carter *et al*<sup>54</sup>).

A variabilidade destas regiões e a consequente diversidade no que diz respeito ao reconhecimento e ligação ao antígeno são promovidas pela existência das três CDRs<sup>48, 55</sup>. Estes domínios hipervariáveis permitem utilizar os anticorpos de domínio único como moléculas individuais, sem a presença da restante cadeia glicoproteica do anticorpo inteiro dado que são eles os responsáveis pelo reconhecimento e ligação ao antígeno.

São inúmeras as vantagens da utilização dos sdAb. Uma vez que são de pequenas dimensões os seus genes podem facilmente ser clonados em vectores de modo a serem expressos em bactérias ou leveduras, obtendo-se elevada expressão, estabilidade e solubilidade. São, portanto, de fácil produção em laboratório e de baixo custo associado. Além disso, as suas reduzidas dimensões permitem o acesso destes anticorpos a alvos difíceis de alcançar pelos anticorpos como as IgG ou por fragmentos de anticorpos de maiores dimensões (por exemplo Fab ou scFv) devido ao seu tamanho, valorizando o seu uso terapêutico. Por outro lado, a sua elevada e rápida permeabilidade fazem com que penetre nos tecidos com facilidade, principalmente em tumores. Também a semelhança de dimensões entre os sdAb e

toxinas, como são exemplo os venenos, permitem prever perfis de biodistribuição semelhantes no organismo, possibilitando uma eficaz neutralização. Outra das vantagens é a possibilidade de poderem ser alterados geneticamente, de modo a melhorar as suas características, sem contudo, perderem as suas propriedades de origem. Deste modo, é possível aumentar *in vitro* a sua afinidade e selectividade de modo a melhorar as suas características ou adequa-las à finalidade que se pretende<sup>48</sup>.

A utilização crescente de anticorpos de domínio único comparativamente a fragmentos de anticorpos de maiores dimensões deve-se, não só à sua elevada estabilidade mas também ao seu reduzido tamanho<sup>56</sup>. As suas reduzidas dimensões são uma mais-valia uma vez que aumentam o seu poder de penetração nos tecidos, possibilitando-os de alcançarem alvos menos acessíveis, e permitem uma rápida eliminação da circulação sanguínea. Em determinadas situações, tempos de meia vida curtos são úteis nomeadamente quando se utilizam anticorpos marcados radioactivamente. No entanto, a aplicação terapêutica geralmente requer tempos de meia vida maiores para que os anticorpos permaneçam mais tempo em circulação. Tal facto pode ser obtido por um processo denominado peguilação que consiste na ligação de moléculas de polietilenoglicol aos grupos amina do anticorpo<sup>57</sup>. Outro dos processos consiste em produzir anticorpos biespecíficos em que um dos anticorpos de domínio único, específico contra o alvo terapêutico se encontra ligado, por um *linker*, a um anticorpo específico para proteínas existentes em circulação com tempos de meia vida longos como é o caso da albumina. Deste modo, os anticorpos ligam-se a estas proteínas, mantendo-se mais tempo em circulação, conservando a sua especificidade para o antígeno<sup>58</sup>.



O sucesso do estudo e aplicação, quer de fragmentos de anticorpos quer de anticorpos de domínio único, deve-se, em parte, à evolução da engenharia genética e à tecnologia de *phage display* que permite uma rápida selecção dos anticorpos obtidos.

## 1.5 – Tecnologia de *phage display*

### 1.5.1 - Bibliotecas de anticorpos

Biblioteca de anticorpos é o nome dado ao conjunto de genes das regiões variáveis das cadeias leves e pesadas dos anticorpos convencionais, amplificados aleatoriamente por intermédio de técnicas de biologia molecular recombinante, clonados num vector apropriado<sup>59</sup>.

Estas bibliotecas podem ser obtidas a partir de qualquer animal cuja estrutura e sequência das imunoglobulinas sejam conhecidas. Os anticorpos são, geralmente, obtidos de humanos, ratinhos, coelhos, e menos frequentemente, de galinhas. Dependendo da origem, as células B (produtoras de imunoglobulinas) podem ser obtidas de linfócitos do sangue periférico, baço e medula óssea<sup>59</sup>.

De um modo geral, para a obtenção de bibliotecas de anticorpos, os genes que codificam para as regiões variáveis das cadeias leves e pesadas dos anticorpos são amplificados por PCR (*Polymerase Chain Reaction*), recorrendo a *primers* específicos. Os fragmentos obtidos são cortados com uma enzima de restrição de corte pouco frequente (como por exemplo SfiI), que permite uma clonagem unidireccional, facilitando a construção das bibliotecas. Para a aplicação em *phage display*, os fragmentos cortados são, posteriormente, clonados num fagemídeo<sup>59</sup>.

As bibliotecas de anticorpos podem ser denominadas imunizadas, *naïve* ou sintéticas.

As bibliotecas imunizadas são compostas por genes de anticorpos amplificados aleatoriamente, a partir de animais que foram imunizados com um antígeno específico.

São obtidos de células B que entraram em contacto com o antígeno e sofreram processo de expansão clonal<sup>44, 59</sup>. Recorrer a bibliotecas imunizadas torna-se vantajoso uma vez que se obtém elevado número de anticorpos específicos e de elevada afinidade para o antígeno. No entanto, a imunização é um processo moroso e não compatível com alguns antígenos como são exemplo toxinas e moléculas pouco imunogénicas<sup>59</sup>.

As bibliotecas *naïve* são obtidas da amplificação aleatória de genes de anticorpos de animais que não foram intencionalmente imunizados contra um antígeno específico. São, portanto, obtidos de células B *naïve*, que não entraram em contacto com o antígeno, não tendo sofrido expansão clonal<sup>44, 59</sup>. Existem vantagens associadas às bibliotecas *naïve*. Estas permitem um rápido isolamento de anticorpos com afinidade para as moléculas alvo uma vez que não é necessária a imunização do animal e são bibliotecas universais, que não apresentam especificidade para nenhum alvo em particular e, a partir das quais, se podem seleccionar anticorpos contra qualquer proteína. São uma mais-valia uma vez que podem ser utilizadas, futuramente, no isolamento de anticorpos contra outros alvos, nomeadamente, proteínas não imunogénicas, tóxicas ou pertencentes ao próprio organismo<sup>59</sup>.

As bibliotecas sintéticas são, também, constituídas a partir de famílias de genes de anticorpos. No entanto, a variabilidade dos CDRs é obtida *in vitro* através de técnicas de biologia molecular e mutagénese<sup>59</sup>.

### **1.5.2 – Selecção de anticorpos por *phage display***

O método de selecção de anticorpos recombinantes mais utilizado consiste na tecnologia de *phage display*. Esta tecnologia permite a selecção de anticorpos com

afinidade e especificidade para uma potencial molécula alvo. As moléculas clonadas são expressas e expostas à superfície do bacteriófago, sob a forma de proteínas de fusão com as proteínas da cápside<sup>59</sup>. A relação entre o genótipo e o fenótipo permite a selecção e enriquecimento de bacteriófagos específicos, ficando estes retidos por ligação à molécula alvo imobilizada. Os bacteriófagos que não se ligaram, por não apresentarem especificidade, são eliminados por sucessivas lavagens<sup>57, 60</sup>.

Para a realização da técnica de *phage display*, os genes dos anticorpos, são clonados num fagemídeo (por exemplo pComb3X). Estes vectores são plasmídeos que contém partes do genoma fágico, nomeadamente uma origem de replicação viral e o gene que codifica para uma proteína da capsídeo viral do bacteriófago (usualmente a pIII). Os genes amplificados dos anticorpos são clonados neste fagemídeo em fusão com a proteína da cápside e transformados em *Echerichia coli* (*E.coli*) por electroporação. Após expressão proteica e depois da super infecção por bacteriófagos M13, vulgarmente denominados fagos *helper*, os anticorpos em fusão com a proteína da cápside serão incorporadas nas partículas virais formadas de novo. Obtém-se uma enorme diversidade de bacteriófagos em que cada um expõe um anticorpo de domínio único diferente à sua superfície<sup>59, 61</sup>.

Segue-se, então o processo de selecção, também denominado de *pannings*. A biblioteca obtida é submetida a uma série de ciclos que tem como objectivo seleccionar os anticorpos com afinidade para a proteína alvo. Cada ciclo tem como base a ligação dos bacteriófagos ao antígeno imobilizado, sucessivas lavagens de modo a eliminar os fagos que não se ligaram ou que se ligaram com pouca afinidade, eluição dos fagos seleccionados e amplificação dos mesmos em *E. coli*<sup>60</sup> (fig.13). O número de ciclos e o grau de estringência aplicado em cada um é variável.

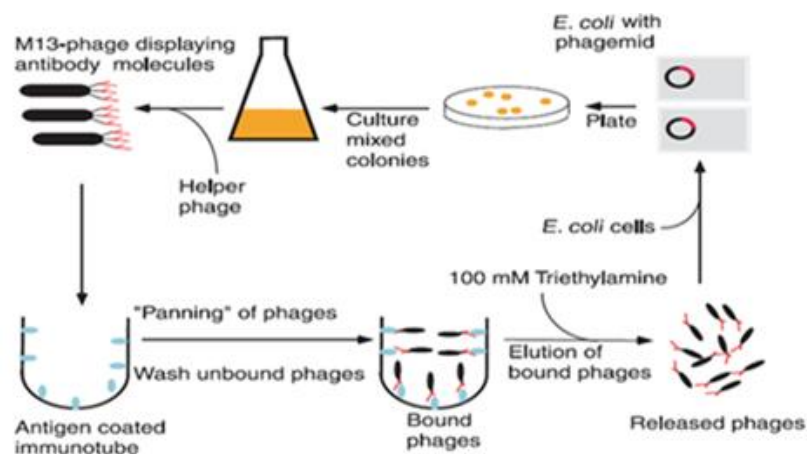


Fig.13 – Esquema representativo de um ciclo de selecção (*panning*) de *phage display* (adaptado de de Bruin *et al*<sup>62</sup>).

O processo de selecção por *phage display* permite o isolamento de anticorpos contra qualquer antígeno, incluindo moléculas do próprio organismo, drogas, moléculas tóxicas ou não imunogénicas, que normalmente seria impossível obter através de sistemas *in vivo*<sup>57, 59</sup>.

## 1.6 – Objectivos

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida representa hoje um dos principais problemas de saúde pública a nível mundial. É uma patologia caracterizada pela destruição progressiva do sistema imunológico com as consequentes múltiplas infecções oportunistas e/ou complicações neurológicas e neoplasias. Os agentes etiológicos responsáveis pela SIDA são os Vírus da Imunodeficiência Humana tipo-1 e tipo-2 (VIH-1 e VIH-2), ambos retrovírus pertencentes à família dos lentivírus.

Nos últimos anos ocorreram avanços impressionantes no tratamento da infecção por VIH e SIDA. A aplicação de combinações de agentes anti-retrovíricos disponíveis actualmente, denominada terapêutica anti-retrovírica combinada (TARc), mudou dramaticamente o decorrer da infecção em muitos indivíduos infectados, levando a um declínio substancial na incidência da SIDA e da mortalidade associada nos países desenvolvidos. No entanto, um dos principais problemas relacionados com o uso de TARc é o desenvolvimento de resistências virais aos fármacos utilizados. Este aspecto da resistência viral é muito importante na medida em que a susceptibilidade aos fármacos diminui, reduzindo, progressivamente, a eficácia das combinações terapêuticas usadas. Deste modo, a erradicação total de VIH parece impossível com as actuais estratégias terapêuticas. Novas terapias e outros alvos mais promissores precisam surgir rapidamente, com o objectivo de combater as formas mais resistentes de VIH que já circulam pelo mundo.

Diversas etapas do ciclo replicativo têm sido identificadas por vários laboratórios como alvos para intervenção farmacológica. Uma das etapas de bastante interesse que tem atraído a atenção de vários grupos de investigação é o processo de entrada/fusão de VIH na célula hospedeira. Este processo envolve uma série de

alterações conformacionais tanto ao nível da partícula viral como da superfície celular. Esta ligação é desencadeada pela glicoproteína gp120 existente à superfície do envelope viral. A interacção proporcionada por esta glicoproteína com o receptor CD4 promove uma série de alterações conformacionais no ectodomínio da proteína gp41 que resultam na fusão da membrana celular e do invólucro viral. A proteína gp41 apresenta-se, deste modo, como um promissor alvo terapêutico visto ter um papel fundamental na entrada de VIH-1 na célula hospedeira.

Em investigação proteómica e em muitas aplicações médicas e biotecnológicas, existe uma necessidade cada vez maior de unidades de reconhecimento moleculares cada vez mais específicas e robustas. As proteínas que desempenham esta função com maior eficácia são os anticorpos, na sua forma tradicional de 150 KDa. No entanto, para o diagnóstico e terapêutica *in vivo*, as formas mais pequenas destas unidades moleculares de reconhecimento darão origem a uma melhor biodistribuição e biodisponibilidade que os anticorpos maiores. Os anticorpos de domínio único são fragmentos monoméricos de anticorpos que consistem, apenas, nas regiões variáveis das cadeias leve (VL) ou pesada (VH) constituintes de um anticorpo como uma IgG. Apresentam dimensões reduzidas ( $\approx 15$  KDa) comparativamente ao anticorpo inteiro ( $\approx 150$  KDa). Os seus genes podem facilmente ser clonados em vectores de modo a serem expressos em bactérias ou leveduras, obtendo-se elevada expressão, estabilidade e solubilidade. São, portanto, de fácil produção em laboratório e de baixo custo associado. Neste âmbito, a selecção de anticorpos de domínio único específicos para a proteína gp41 poderá ser bastante promissora na inibição do processo de fusão da partícula viral na célula hospedeira.

Neste contexto, o trabalho apresentado teve como objectivo principal seleccionar anticorpos de domínio único específicos para a proteína transmembranar gp41, a partir

de uma biblioteca *naïve* de anticorpos VL de coelho, construída para o efeito. De um modo mais específico, o trabalho apresentado consistiu em produzir anticorpos de domínio único que, pelas suas reduzidas dimensões, se conseguissem ligar a regiões pouco acessíveis da proteína gp41 de modo a bloquear o processo de fusão, impedindo a entrada do vírus na célula.

Numa primeira fase procedeu-se à construção de bibliotecas *naïve* de anticorpos VL, por amplificação dos genes das diferentes famílias dos domínios VL, por PCR a partir de cDNA obtido do baço e medula óssea de um coelho não imunizado, e clonagem num vector apropriado. Numa segunda fase, efectuou-se o isolamento dos anticorpos específicos para a proteína gp41 e domínio HR1 com recurso à técnica de *phage display*. Em seguida, procedeu-se à selecção dos anticorpos específicos e de elevada actividade/ligação para a molécula alvo e a sua caracterização, em termos de especificidade e expressão/solubilidade. Numa última fase, efectuaram-se ensaios *in vitro* para verificar a capacidade de inibição da fusão do envelope viral com o receptor CD4 pela acção dos anticorpos seleccionados, com vista a uma potencial utilização destes anticorpos na terapêutica anti-retrovírica.

O presente trabalho foi realizado na Technophage SA, sediada no Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa. A Technophage investiga e desenvolve anticorpos de domínio único para aplicações terapêuticas nas áreas de oncologia, doenças inflamatórias e infecciosas.



**Capítulo 2**  
**Materiais e Métodos**

---

## **2.1 – Construção de bibliotecas *naïve* de anticorpos de domínio único VL, derivada de coelhos**

### **2.1.1 – Obtenção de baço e medula óssea de coelho**

O animal utilizado para este estudo foi um coelho *New Zealand* albino. Todo o processo da eutanásia do coelho e extracção do baço e medula óssea foi efectuado nas instalações da Faculdade de Veterinária de Lisboa, por pessoas qualificadas para o efeito. Procedeu-se à eutanásia do coelho e extraiu-se o baço e a medula óssea. Estes órgãos foram colocados, em separado, em 10 ml de Tri Reagent<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Estados Unidos da América (EUA)) para posterior extracção de mRNA.

### **2.1.2 - Extracção de mRNA de coelho**

O baço e a medula óssea, já em 10 ml de Tri Reagent<sup>®</sup> foram homogeneizados e incubados à temperatura ambiente, durante 5 minutos (min). Adicionou-se mais 20 ml de Tri Reagent<sup>®</sup> a cada amostra e centrifugou-se a 2500g, 10 min a 4°C. Transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo, descartou-se o sedimento e adicionou-se 3 ml de bromo-cloro-propano (BCP) (Sigma-Aldrich). Os tubos foram agitados e incubados à temperatura ambiente, 15 min. Em seguida, centrifugou-se a 17500g, 10 min a 4°C. O sobrenadante foi novamente recolhido, descartado o sedimento, e adicionado 15 ml de isopropanol (Sigma-Aldrich). Os tubos foram agitados e incubados à temperatura ambiente, 10 min. Centrifugou-se novamente a 17500g, 10 min a 4°C. O sobrenadante foi removido e descartado e o sedimento foi lavado com 30 ml de etanol 75%, tendo o

cuidado não o ressuspender. Efectuou-se uma última centrifugação a 17500g, 10 min a 4°C. Os sobrenadantes foram removidos e descartados e os sedimentos foram secos ao ar, à temperatura ambiente, e ressuspensos em 500 µl de água ultra-pura (Gibco, Invitrogen, Califórnia, EUA). A quantidade e grau de pureza dos mRNAs obtidos foram determinados pela leitura da densidade óptica (DO) a 260 e 280 nm (40 ng/µl RNA equivale a uma DO =1 e a razão  $DO_{260}/DO_{280}$  permite determinar o grau de pureza, situando-se este entre 1,6 e 1,9).

### **2.1.3 – Síntese cDNA**

A síntese do DNA complementar (cDNA) a partir do mRNA extraído foi efectuada com recurso ao kit “SuperScript™ III First-strand Synthesis Supermix” (Invitrogen), conforme instruções do fabricante.

Após obtenção do cDNA do baço e medula óssea, procedeu-se à sua quantificação e à determinação do grau de pureza por espectrofotometria, recorrendo-se ao equipamento NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, EUA). Para verificar a integridade das moléculas sintetizadas efectuou-se uma análise em gel de agarose a 1,5% em TBE 0,5x (45mM Tris base, 45mM ácido bórico, EDTA 0,5M pH8,0), corado com 0,8 µg/ml de brometo de etídeo (AppliChem, Darmstadt, Alemanha). O gel foi visualizado e fotografado num transiluminador com recurso ao sistema EDAS 290 da Kodak (Eastman Kodak Company, Nova Iorque, EUA).

### 2.1.4 - Amplificação, por PCR, dos genes correspondentes às famílias de sdAb VL

A obtenção dos genes que codificam para as diferentes famílias de anticorpos de domínio único VL foram amplificadas através de oligonucleótidos específicos. Os nomes e sequências dos oligonucleótidos utilizados encontram-se no quadro abaixo:

Tabela 1 – Nome e sequência dos oligonucleótidos utilizados para amplificação dos genes que codificam para os anticorpos de domínio único VL de coelho.

Oligonucleótido	Sequência 5'-3'
RSCVK1-F	GGGCCCAGGCGGCCGAGCTCGTGMTGACCCAGACTCCA
RSCVK2-F	GGGCCCAGGCGGCCGAGCTCGATMTGACCCAGACTCCA
RSCVK3-F	GGGCCCAGGCGGCCGAGCTCGTGATGACCCAGACTGAA
RSC $\lambda$ -F	GGGCCCAGGCGGCCGAGCTCGTGCTGACTCAGTCGCCCTC
SDVLj10-B	CCTGGCCGGCCTGGCCTTTGATTTCCACATTGGTGCC
SDVLj0-B	CCTGGCCGGCCTGGCCTAGGATCTCCAGCTCGGTCCC
SDVL42j0-B	CCTGGCCGGCCTGGCCTTTGACSACCACCTCGGTCCC
SDVL $\lambda$ -B	CCTGGCCGGCCTGGCCGCCTGTGACGGTCAGCTGGGTCCC

O esquema de conjugação dos oligonucleótidos *forward* (F) e *reverse* (B) para amplificação de cada família foi a seguinte:

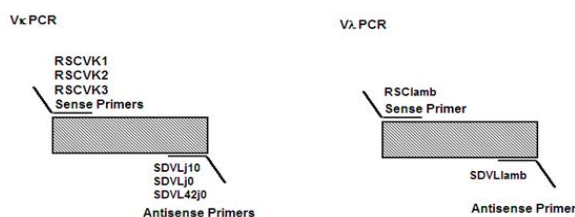


Fig.14 – Esquema de amplificação das várias famílias de VL com os respectivos oligonucleótidos<sup>59</sup>

O ensaio de PCR foi efectuado com aproximadamente 100 ng de cDNA e utilizando o kit de PCR Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes, Espoo, Finlândia). A mistura utilizada para amplificação de cada família foi composta por:

Tabela 2 – Componentes e respectivas quantidades adicionadas para cada reacção de PCR.

Componente	Quantidade (µl)
cDNA (≈ 100 ng)	x
Oligonucleótido <i>forward</i> (20 pmol/µl)	1,5
Oligonucleótido <i>reverse</i> (20 pmol/µl)	1,5
Tampão Phusion 5x	10
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	3
dNTPs (10 mM)	1
Phusion DNA polimerase	0,2
H <sub>2</sub> O ultra pura	até perfazer 50 µl

As reacções de amplificação foram efectuadas num termociclador Piko Thermal Cycler (Finnzymes). O programa utilizado foi o seguinte:

Tabela 3 – Condições de PCR utilizadas para amplificação das famílias de anticorpos VL.

Processo	Duração e temperatura	Número de ciclos
Desnaturação	3 min a 98°C	-
Desnaturação	10 seg a 98°C	30
Hibridação	30 seg a 56°C	
Extensão	30 seg a 72°C	
Terminação	10 min a 72°C	-

Foi verificada a amplificação de cada família analisando uma alíquota em gel de agarose a 1,5% em TAE 1x (40mM Tris base, 1mM EDTA 0,5M pH8,0, 20mM ácido acético glacial), corado com 0,8 µg/ml de brometo de etídeo (AppliChem). O gel foi visualizado e fotografado no transiluminador.

### **2.1.5 – Precipitação dos produtos PCR correspondentes aos domínios VL**

Após a junção dos produtos PCR correspondentes dos domínios VL, procedeu-se à precipitação do DNA com acetato de sódio de modo a diminuir o volume para que mais facilmente se proceda à sua purificação. Ao volume total de DNA adicionou-se 0,1 volumes (V) de acetato de sódio 3M pH 5,2, 2,5 V de etanol absoluto frio e 1 µl de glicogénio 20 mg/ml e incubou-se durante a noite a -80°C. No dia seguinte, centrifugou-se a 13200 g, retirou-se o sobrenadante, lavou-se o sedimento com 1 ml de etanol 70% e voltou a centrifugar-se. Retirou-se, novamente o sobrenadante e secou-se o sedimento de DNA ao ar. Este sedimento foi ressuscitado em água ultra pura (quantidade ajustada a cada biblioteca).

### **2.1.6 – Purificação dos produtos PCR dos domínios VL**

Depois de precipitados, os produtos PCR foram purificados em gel de agarose *low melt* a 2% em TAE 1x, corado com 0,8 µg/ml de brometo de etídeo. A purificação foi realizada a baixa voltagem. Depois de separadas as amostras, o gel foi visualizado no transiluminador, e identificada a banda correspondente aos produtos PCR

pretendidos. De seguida, a banda identificada foi cortada com uma lâmina e extraído o DNA do gel com o kit QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha), seguindo as recomendações do fabricante. Depois de extraído o DNA, procedeu-se novamente à sua precipitação com acetato de sódio.

### **2.1.7 – Digestão com SfiI dos DNAs dos produtos PCR correspondentes aos domínios VL purificados**

De modo a clonar os fragmentos amplificados no vector apropriado, digeriu-se tanto o vector pComb3X-SS<sup>63</sup> como os produtos PCR purificados com a enzima de restrição SfiI (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha). As condições aplicadas para a digestão do vector e dos fragmentos foram diferentes, tendo-se utilizado 6U SfiI/μg DNA para a digestão do pComb3X-SS e 16 U SfiI/μg DNA para a digestão dos produtos PCR. As condições de digestão foram as seguintes:

Tabela 4 - Componentes e respectivas quantidades utilizadas na digestão do vector pComb3X-SS.

Componente	Quantidade
pComb3X-SS (20 μg)	x μl
SfiI (40 U/μl) (6U/μg DNA)	3μl (120 U)
Tampão M 10x	20 μl
H <sub>2</sub> O ultra pura	até perfazer 200 μl

Tabela 5 – Componentes e respectivas quantidades utilizadas na digestão dos produtos PCR correspondentes aos domínios VL.

Componente	Quantidade
DNA VL (20 µg)	x µl
SfiI (40 U/µl) (16U/µg DNA)	8µl (320 U)
Tampão M 10x	20 µl
H <sub>2</sub> O ultra pura	até perfazer 200 µl

As digestões foram incubadas a 50°C, durante a noite.

Após digestão, os DNAs foram novamente purificados em gel de agarose. O vector pComb3X foi purificado em gel de agarose *low melt* a 0,8% em TAE 1x, corado com 0,8 µg/ml de brometo de etídeo e os produtos PCR dos domínios VL foram purificados em gel de agarose *low melt* a 2.0% em TAE 1x, igualmente corado com 0,8 µg/ml de brometo de etídeo.

Depois de separadas as amostras, os géis foram visualizados no transiluminador, e identificadas as bandas correspondentes ao vector e aos produtos PCR digeridos. De seguida, as bandas identificadas foram cortadas com uma lâmina e extraído o DNA do gel com o kit QIAquick<sup>®</sup> Gel Extraction Kit (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante. Depois de extraído o DNA, procedeu-se novamente à sua precipitação com acetato de sódio, como descrito anteriormente.



### 2.1.8 – Clonagem dos domínios VL no vector pComb3X

Os fragmentos correspondentes aos domínios VL, de baço e medula óssea, foram clonados no vector pComb3X. Efectuou-se a ligação de cada biblioteca (baço e medula óssea), na sua totalidade, a proporção utilizada de pComb3X/inserto foi de 1:3, e os constituintes da mistura de ligação foram os seguintes:

Tabela 6 - Componentes e respectivas quantidades utilizadas na clonagem dos domínios VL no vector pComb3X.

Componente	Quantidade
pComb3X digerido SfiI (1,4 µg)	x µl
VL digerido com SfiI (4,2 µg)	y µl
Tampão da T4 DNA ligase 10x	20 µl
T4 DNA ligase (400000 U/ml)	10 µl
H <sub>2</sub> O ultra pura	até perfazer 200 µl

As ligações foram incubadas a 16°C, durante a noite.

No dia seguinte, efectuou-se a transformação, por electroporação, do vector em *Escherichia coli* (*E.coli*) SS320 (Genentech Inc., South San Francisco, EUA) com uma competência de  $10^9$  colónias/µg plasmídeo. Utilizou-se, para tal, um electroporador BioRad GenePulser Xcell (BioRad, Hercules, EUA) e as condições utilizadas para a distribuição do pulso foram 1800 V, 25 µF e 200 Ω. A transformação foi efectuada em cuvetes de 1mm de espessura, com 6,7 µl de ligação e 100 µl de *E.coli* SS320 competentes. Imediatamente após o pulso, adicionou-se 1 ml de meio SOC a cada cuvette, juntaram-se todas as transformações de cada biblioteca num tubo e incubou-se

1h, 37°C, a 250 rpm. De seguida foi verificada a existência de inserto nos clones obtidos e efectuada a técnica de *phage display*.

### 2.1.9 - Ensaio de PCR para verificação da existência de inserto nos clones obtidos

Após as clonagens efectuaram-se ensaios de PCR a partir de colónias obtidas das transformações das ligações, de modo a verificar a existência do gene clonado nos clones obtidos. O ensaio de PCR foi efectuado recorrendo directamente à bactéria e não ao seu DNA isolado. Para tal, inoculou-se 20 µl de água ultra pura com aproximadamente 10 clones, separadamente, e incubou-se a 94°C durante 5 min. O extracto obtido, cerca de 5 µl, foi aplicado directamente na reacção de PCR. Utilizou-se o kit de PCR Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes). Os nomes e sequências dos oligonucleótidos utilizados encontram-se no quadro abaixo:

A mistura utilizada para a reacção de PCR foi composta por:

Tabela 7 – Componentes e respectivas quantidades adicionadas para cada reacção de PCR para verificação de inserto nos clones obtidos.

Componente	Quantidade (µl)
DNA (extracto bacteriano)	5
Oligonucleótido RSC-F (20 pmol)	0,8
Oligonucleótido RSC-B (20 pmol)	0,8
Tampão Phusion 5x	5
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,5
dNTPs (10 mM)	0,5
Phusion DNA polimerase	0,2
H <sub>2</sub> O ultra pura	11,2

Tabela 8 – Nome e sequência dos oligonucleótidos utilizados para verificação da presença dos genes que codificam para os anticorpos de domínio único VH e VL clonados no vector pComb3X.

Oligonucleótido	Sequência 5'-3'
RSC-F	GAGGAGGAGGAGGAGGAGGCGGGGCCAGGCGGCCGAGCTC
RSC-B	GAGGAGGAGGAGGAGGAGCCTGGCCGGCCTGGCCACTAGTG

As reacções de amplificação foram efectuadas num termociclador Piko Thermal Cycler (Finnzymes). O programa utilizado foi igual ao mencionado no ponto 2.1.4.

A presença do gene clonado foi verificada analisando uma alíquota em gel de agarose a 1,5% em TBE 0.5x, corado com 0,8 µg/ml de brometo de etídeo (AppliChem). O gel foi visualizado e fotografado no transiluminador.

## 2.2 – Selecção de sdAb específicos contra a gp41 e HR1, por *phage display*

Uma vez obtidas as bibliotecas *naïve*, procedeu-se à selecção dos anticorpos específicos para a proteína gp41 e péptido HR1, através da técnica de *phage display*.

Após a transformação das bibliotecas, as culturas foram incubadas 1h, 37°C e 250 rpm. Posteriormente, adicionou-se 5 ml de meio SOC contendo 3 µl de ampicilina 100 mg/ml e incubou 1h, 37°C, 250 rpm. Adicionou-se mais 4,5 µl de ampicilina 100 mg/ml e incubou, novamente, 1h, 37°C, 250 rpm. Após a selecção com ampicilina, procedeu-se à infecção com fagos *helper*. À cultura adicionou-se 2 ml destes fagos e 183 ml de meio SOB contendo 92,5 µl de ampicilina 100 mg/ml e incubou 2h a 37°C, 250 rpm. Adicionou-se 280 µl canamicina 50 mg/ml e incubou-se durante a noite, 37°C,

250 rpm. No dia seguinte, os bacteriófagos produzidos, contendo os anticorpos à sua superfície, foram recuperados por precipitação pela adição de 6% de NaCl e 8% de polietilenoglicol 8000 (PEG8000) e incubados no gelo durante uma hora. Após centrifugação a 8000 g, os bacteriófagos foram ressuspensos em PBS 1x e filtrados com filtro de 0,22 µm (Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Bélgica) estando prontos para o primeiro ciclo de selecção.

Neste processo, 1 µg de gp41 e HR1 foi imobilizada em 4 poços, numa placa de ELISA, que ficou a incubar durante a noite a 4°C. No dia seguinte, os poços foram lavados com 150 µl de PBS 1x e bloqueados com 150 µl de PBS/BSA 3% durante 1h a 37°C. Após bloquear, retiraram-se apenas 100 µl de PBS/BSA 3% de cada poço e adicionou-se 100 µl dos bacteriófagos obtidos. Incubou 2h a 37°C. Após incubação retirou-se a solução fágica dos poços e efectuaram-se 5 lavagens sucessivas com PBS/Tween20 0,5% de modo a eliminar os anticorpos não específicos que não se ligaram à proteína imobilizada. Para recuperar os anticorpos que ficaram ligados ao antígeno adicionou-se, a cada poço, 100 µl tripsina 10mg/ml em PBS 1x e incubou-se 30 min à temperatura ambiente. Pipetou-se, então, para cima e para baixo 10x e recolheu-se o volume para um microtubo. Depois da selecção, procedeu-se à reamplificação dos fagos, pela infecção de uma cultura de *E. coli* SS320 (D.O.  $\approx$  0.600 nm), 30 min à temperatura ambiente. Após incubação adicionou-se 6 ml de meio SOB contendo 3,2 µl de ampicilina 50 mg/ml e incubou 1h, 37°C, 250 rpm. Adicionou-se mais 4,8 µl de ampicilina 50 mg/ml e incubou, novamente, 1h, 37°C, 250 rpm. Após a selecção com ampicilina, procedeu-se à infecção com fagos *helper*. À cultura adicionou-se 1 ml destes fagos e 91 ml de meio SOB contendo 92 µl de ampicilina 50 mg/ml e incubou 2h a 37°C, 250 rpm. Adicionou-se 140 µl canamicina 50 mg/ml e ficou durante a noite, 37°C, 250 rpm.

Os bacteriófagos produzidos foram novamente recuperados por precipitação com NaCl e PEG 8000 como descrito anteriormente e voltou a efectuar-se novo ciclo de selecção.

Foram efectuados 4 *pannings*, ou seja, 4 ciclos de selecção em que apenas se alterou o número de lavagens em cada ciclo tendo sido efectuadas 5 lavagens no 1º *panning*, 10 lavagens no 2º e 3º *pannings* e 15 lavagens no 4º *panning*. A quantidade de antígeno imobilizado na placa manteve-se inalterável e igual a 1 µg.

A tabela seguinte resume as condições utilizadas em cada ciclo de selecção:

Tabela 9 – Resumo das condições utilizadas em cada ciclo de selecção do *phage display*.

	1º <i>panning</i>	2º <i>panning</i>	3º <i>panning</i>	4º <i>panning</i>
Nº lavagens	5x	10x	10x	15x
Antígeno	1 µg	1 µg	1 µg	1 µg
Tween 20	0,5%	0,5%	0,5%	0,5%

## 2.3 - *Screening* e caracterização dos anticorpos de domínio único seleccionados

### 2.3.1 – Clonagem dos genes dos sdAb seleccionados, por *phage display*, no vector pT7-PL (pT7-*peptide leader*)

A partir das bactérias guardadas do 4º *panning* do *phage display* para selecção de anticorpos contra gp41 e HR1 foi extraído o DNA utilizando JETstart Plasmid

Purification MIDI kit (GENOMED GmbH, Löhne, Alemanha) seguindo as recomendações do fabricante.

Obtido o DNA, este foi digerido com a enzima de restrição SfiI (Roche) para se obterem as sequências isoladas dos anticorpos e clonar no vector pT7-PL (vector pT7 com uma sequência *peptide leader* clonada que permite a expressão dos anticorpos para o espaço periplasmático). De igual modo, digeriu-se o vector pT7-PL (pT7-*peptide leader*) com a mesma enzima. As condições de digestão foram as seguintes:

Tabela 10 - Componentes e respectivas quantidades utilizadas na digestão do vector pT7-PL.

Componente	Quantidade
pT7-PL (20µg)	x µl
SfiI (10U/µl)	2 µl
Tampão M 10x	20 µl
H <sub>2</sub> O ultra pura	até perfazer 200 µl

Tabela 11 – Componentes e respectivas quantidades utilizadas na digestão dos domínios VL dos DNAs do 4º *panning* do *phage display*.

Componente	Quantidade
DNA VL (20µg)	x µl
SfiI (10U/µl)	2 µl
Tampão M 10x	20 µl
H <sub>2</sub> O ultra pura	até perfazer 200 µl

As digestões foram incubadas a 50°C, durante a noite.

Após digestão, os DNAs foram purificados em gel de agarose. O vector pT7-PL foi purificado em gel de agarose *low melt* a 0,8% em TAE 1x, corado com 0,8 µg/ml de brometo de etídeo, enquanto o DNA dos anticorpos de domínio único VH e VL foram purificados em gel de agarose *low melt* a 2,0% em TAE 1x, igualmente corado com 0,8 µg/ml de brometo de etídeo. A purificação foi realizada a baixa voltagem para uma melhor separação do DNA.

Depois de separadas as amostras, os géis foram visualizados no transiluminador e identificadas as bandas correspondentes ao vector e ao DNA dos anticorpos obtidos por digestão. De seguida, as bandas identificadas foram cortadas com uma lâmina e extraído o DNA do gel com o kit QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen) seguindo as recomendações do fabricante. Depois de extraído o DNA, procedeu-se novamente à sua precipitação com acetato de sódio.

O DNA correspondente aos anticorpos VL anti-gp41 e anti-HR1 foi clonado no vector pT7-PL. Recorreu-se ao CloneDirect™ Rapid Ligation Kit (Lucigen Corporation, Middleton, EUA) onde a proporção de pT7/inserto utilizada foi de 1:3. As ligações foram efectuadas seguindo as recomendações do fabricante. Os constituintes da mistura de ligação foram os seguintes:

Tabela 12 - Componentes e respectivas quantidades utilizadas na clonagem dos domínios VL no vector pT7-PL.

Componente	Quantidade
DNA pT7-PL digerido SfiI (150 ng)	x µl
VL anti-gp41/HR1 digerido com SfiI (50 ng)	y µl
Tampão 10x do kit	2 µl
Ligase	1 µl
H <sub>2</sub> O ultra pura	até perfazer 20 µl

O controlo da ligação foi efectuado de igual modo mas sem colocar na reacção o DNA correspondente aos VL anti-gp41/HR1. As ligações foram incubadas a 23°C, durante 2 horas (h). Após ligação, as reacções foram inactivadas a 70°C durante 15 min.

Efectuou-se, então, a transformação, por electroporação, do vector em *E.coli* BL21 (Lucigen) com uma competência de  $10^8$  colónias/ $\mu$ g plasmídeo. Utilizou-se, para tal, o electroporador BioRad GenePulser Xcell (BioRad) e as condições utilizadas para a distribuição do pulso foram as indicadas no kit sendo estas 1800 V, 10  $\mu$ F e 600  $\Omega$ . A transformação foi efectuada em cuvetes de 1mm de espessura, com 1  $\mu$ l de ligação e 25  $\mu$ l de *E.coli* BL21 competentes. Imediatamente após a distribuição do pulso, adicionou-se 1 ml de meio SOC a cada cuvette, transferiu-se para um tubo e incubou-se uma 1h, a 37°C, a 250 rpm. Após incubação plaqueou-se 10  $\mu$ l e 100  $\mu$ l em placas de meio LB com 100  $\mu$ g/ml de ampicilina. As placas incubaram durante a noite a 37°C.

Obtidos os transformantes, efectuaram-se ensaios de PCR a partir de colónias obtidas de modo a verificar a percentagem de clones contendo o gene clonado. Este procedimento foi efectuado de modo igual ao descrito em 2.1.9.

### **2.3.2 - Selecção de anticorpos específicos para gp41 e HR1**

A selecção de anticorpos específicos para a gp41 e HR1 foi efectuada num sistema automatizado Hamilton – Microlab Star (Hamilton, Bonaduz, Suíça) que permitiu, de um modo rápido, efectuar o *screening* de elevado número de clones em simultâneo. Com este sistema foi possível analisar 384 anticorpos contra a proteína alvo.



Das colónias obtidas no ponto anterior, 384 foram repicadas individualmente, por intermédio do robot, para 200 µl de meio de cultura *Super Broth* (SB) contendo o sistema de autoindução Overnight Express™ Autoinduction System 2 (Merck Biosciences, Nottingham, Reino Unido), em placas de 96 poços, e incubadas durante a noite a 30°C a 250 rpm. No dia seguinte, adicionou-se 20 µl de tampão PBS 1x contendo BugBuster® Protein Extraction Reagent (Merck) e um *cocktail* de anti-proteases Complete, EDTA-free (Roche). Após incubação de meia hora a 4°C, a fracção solúvel foi recolhida por centrifugação a 1500 g, 15 min e realizado um ensaio de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) de modo a identificar quais os anticorpos que apresentavam elevada expressão e, conjuntamente elevados valores de ligação, para a proteína gp41 e HR1.

No dia anterior ao ensaio de ELISA é efectuada a ligação do antígeno, neste caso gp41 e HR1, à placa de 384 poços. Foi adicionado a cada poço 100 ng de gp41 ou HR1 em PBS 1x e incubado durante a noite a 4°C.

Para o estudo de ligação dos anticorpos à molécula alvo, a placa já com o antígeno ligado foi lavada 3 vezes com tampão PBS 1x num lavador de placas ELx405™ (BioTek, Winooski, EUA) e adicionado 40 µl de solução bloqueante (Roche). Incubou-se a 30°C, durante 1h. Lavou-se a placa, novamente, com tampão PBS 1x e adicionou-se 40 µl de cada extracto solúvel contendo o anticorpo em estudo. Incubou-se a 30°C, durante 1h. Repetiu-se a lavagem 5 vezes com tampão PBS 1x e adicionou-se 40 µl de anticorpo anti-HA-HRP tendo-se deixado a incubar 1h a 30°C. Por fim, lavou-se a placa 5 vezes com tampão PBS 1x e adicionou-se 40 µl do substrato ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)) (Roche). As leituras das DO a 405 nm foram efectuadas ao fim de 1h, num leitor de ELISA PowerWave™

(BioTek). Os controlos foram efectuados de maneira semelhante mas sem a ligação da proteína alvo à placa.

Para o controlo da expressão dos anticorpos, efectuou-se o processo descrito anteriormente com a excepção da ligação da gp41/HR1 na placa.

Após análise dos valores das absorvências, foram escolhidos os clones que apresentaram valores mais elevados de expressão/solubilidade e ligação. Foram guardados a -80°C, em meio SB com 20% de glicerol (Applichem).

### **2.3.3 – Ensaio de expressão e ligação à proteína alvo**

Com o intuito de seleccionar os melhores clones de entre os já obtidos, com base nos valores de expressão e ligação à proteína alvo, voltou a repetir-se o ensaio de ELISA. No entanto, neste ensaio, para além de incubar os anticorpos VL anti-gp41 com a proteína gp41 imobilizada na placa e os anticorpos VL anti-HR1 com o HR1 imobilizado, foram, também incubados os anticorpos VL anti-gp41 com o HR1 imobilizado na placa e os anticorpos VL anti-HR1 com a proteína gp41, para testar o reconhecimento dos epítomos reconhecidos pelos anticorpos.

Os ensaios para verificar a expressão e a ligação à gp41 e HR1 foram efectuados como descrito em 2.3.2.

### **2.3.4 – Sequenciação e análise de sequências dos clones de VL anti-gp41 e anti-HR1 seleccionados**

A sequenciação foi efectuada pela empresa Macrogen Inc (Seoul, Korea).

As sequências nucleotídicas obtidas foram traduzidas para sequências aminoacídicas e analisadas com recurso ao software “Vector NTI” (Invitrogen).

Em todas as sequências foram identificadas as *frameworks*, os CDRs e foi efectuada o estudo de homologia.

### **2.3.5 – Expressão e purificação dos clones de VL anti-gp41 e anti-HR1 seleccionados**

A partir de uma cultura de cada clone dos anticorpos VL anti-gp41 e anti-HR1 seleccionados efectuou-se uma diluição de 1:50 em 25 ml de meio SB contendo ampicilina 100 µg/ml e incubou-se a 37°C, 250 rpm até uma D.O. de aproximadamente 0,6. As culturas foram induzidas com 0,6 mM IPTG (*Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*) e incubadas 5h a 30°C.

Após indução, as culturas foram centrifugadas a 8000 g, 20 min, a 4°C e o sedimento foi ressuspendido em tampão de lavagem contendo anti-proteases. Aos sedimentos ressuspendidos, e antes da purificação, efectuaram-se 2 ciclos de sonicação durante 3 min, com pulso alternado, sempre no gelo. Após sonicação, foram centrifugados a 8000 g, 20 min a 4°C, recuperados os sobrenadantes e filtrados com filtros de seringa de 0,22 µm (Orange Scientific).

A purificação foi efectuada com colunas TALONspin™ Columns (Clontech, Takara Bio Inc., Shiga, Japão). Para tal, Os sobrenadantes foram aplicados nas colunas TALON já equilibradas com tampão de lavagem. As colunas foram centrifugadas a 700 g, 2 min a 4°C. Após aplicação da amostra, as colunas foram lavadas cinco vezes com tampão de lavagem, centrifugando, de cada vez, a 700 g, 2 min a 4°C. Após lavagem, a proteína foi eluída da matriz pela aplicação de 1 ml de tampão eluição e centrifugada novamente nas mesmas condições. Os volumes eluídos foram guardados a 4°C e foi avaliado o seu grau de pureza por SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) e *western blot*. A quantidade de proteína foi determinada com recurso ao Nanodrop.

#### **2.4 – Ensaio celular de inibição da fusão envelope viral/CD4 pelos VL anti-gp41 e anti-HR1**

As células HeLa243env expondo o envelope de VIH-1 à sua superfície foram incubadas com os VL anti-gp41 e anti-HR1, tendo esta mistura sido incubada, posteriormente, com células HeLa CD4 LTR-β-Gal. Este ensaio permitiu verificar a existência de inibição da fusão do envelope viral e do receptor CD4, promovida pelos anticorpos produzidos.

A 100 µl de células HeLa243env (aproximadamente 20 000 células/poço) adicionaram-se duas concentrações diferentes de VL anti-gp41 e anti-HR1 (250 nM e 50 nM) em meio DMEM e incubou-se 3h a 37°C em atmosfera com 5% CO<sub>2</sub> (ensaio efectuado em duplicado).

Após incubação, retirou-se o meio das células HeLa CD4 LTR- $\beta$ -Gal (plaqueadas numa placa de 96 poços separadamente, com aproximadamente 10 000 células/poço) e adicionou-se os 200  $\mu$ l da mistura das células HeLa243env e dos VL anti-gp41 e anti-HR1 e incubou-se 48h, 37°C em atmosfera com 5% CO<sub>2</sub>. Lavaram-se os poços da placa com PBS1x, adicionou-se 100  $\mu$ l de tampão lise e incubou-se durante a noite a -80°C.

A capacidade de inibição da fusão envelope viral/CD4 foi avaliada pela quantificação da actividade da  $\beta$ -galactosidase utilizando o ensaio colorimétrico baseado na clivagem do CPRG (*chlorophenolred- $\beta$ -D-galactopyranoside*) pela  $\beta$ -galactosidase. Se ocorrer a fusão entre as células HeLa243env e HeLa CD4 LTR- $\beta$ -Gal, a  $\beta$ -galactosidase é expressa por estas últimas. O substrato CPRG, quando clivado pela  $\beta$ -galactosidase, forma um produto de cor vermelho, que é lido espectrofotometricamente a 550nm.

Após as 48h de incubação, a placa foi descongelada e adicionou-se 100 $\mu$ l tampão de lise contendo 0,1% do reagente CPRG (Roche) e incubou-se a 37°C até visualização de coloração avermelhada. A reacção colorimétrica foi avaliada pela leitura espectrofotométrica a 550nm.

O controlo positivo de inibição da fusão envelope/CD4 foi efectuado utilizando o péptido T20 (utilizado nas mesmas concentrações que os VL anti-gp41 e HR1) e o controlo negativo foi efectuado utilizando um anticorpo VL irrelevante (também nas mesmas concentrações).

## **Capítulo 3**

# **Resultados**

---

### 3.1 – Construção de bibliotecas *naïve* de anticorpos de domínio único VL, derivada de coelhos

#### 3.1.1 - Extracção de RNA de coelho e síntese de cDNA

De modo a construir as bibliotecas de anticorpos, foi necessário obter o mRNA e, posteriormente, o cDNA para amplificação por PCR. Para tal, o mRNA foi extraído, tanto do baço como da medula óssea do coelho, e efectuada a síntese do respectivo cDNA. Obtiveram-se 4,4 µg/µl de RNA do baço e 1,8 µg/µl de RNA de medula óssea. Relativamente ao cDNA, obtiveram-se 921 ng/µl de cDNA do baço e 1018 ng/µl de medula óssea.

Os RNAs e cDNAs foram analisados num gel de agarose de modo a confirmar a sua integridade (fig.15). Tanto os RNA como os cDNA apresentam os perfis esperados<sup>59</sup>.

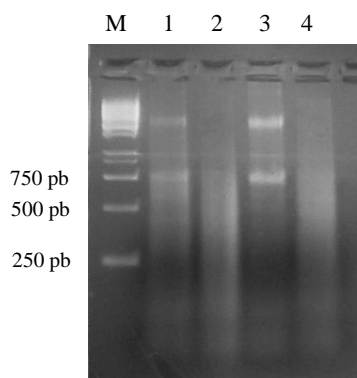


Fig.15 – Gel de agarose a 1,5% com as amostras de RNA e cDNA do baço e medula óssea (M – marcador de peso molecular, 1 – RNA do baço ( $\approx 800$  ng), 2 – cDNA sintetizado a partir de RNA do baço ( $\approx 4$  µg), 3 – RNA de medula óssea ( $\approx 800$  ng), 4 – cDNA sintetizado a partir de RNA da medula óssea ( $\approx 4$  µg)).

### 3.1.2 - Amplificação, por PCR, dos genes correspondentes às famílias de sdAb VL

Após extracção do RNA e síntese do cDNA, procedeu-se à amplificação dos genes dos domínios VL por PCR com primers específicos para cada família (VLk1, VLk2, VLk3 e VL $\lambda$ ). Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose para confirmação de amplificação. Os fragmentos relativos às várias famílias de VL, obtidos a partir de cDNA de baço e medula óssea, apresentam um peso molecular de aproximadamente 400 pb, correspondente ao tamanho esperado (fig.16 e 17).

#### VLs amplificados de cDNA do baço:

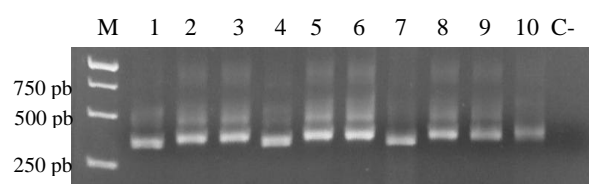


Fig.16 – Amplificação, por PCR, a partir de cDNA do baço, dos genes que codificam para as famílias de VL (M – marcador de peso molecular, 1 – VLk1/j10, 2 – VLk1/jo, 3 - VL k1/42jo, 4 - VLk2/j10, 5 - VLk2/jo, 6 - VLk2/42jo, 7 - VLk3/j10, 8 – VLk3/jo, 9 - VLk3/42jo, 10 – VL $\lambda$ , C- - controlo negativo PCR (sem DNA)).

#### VLs amplificados de cDNA de medula óssea:

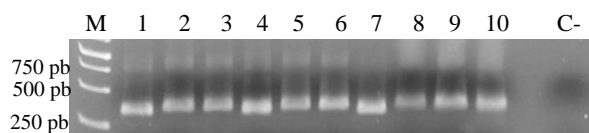


Fig.17 – Amplificação, por PCR, a partir de cDNA de medula óssea, dos genes que codificam para as famílias de VL (M – marcador de peso molecular, 1 – VLk1/j10, 2 – VLk1/jo, 3 - VLk1/42jo, 4 - VLk2/j10, 5 - VLk2/jo, 6 - VLk2/42jo, 7 - VLk3/j10, 8 – VLk3/jo, 9 – VLk3/42jo, 10 – VL $\lambda$ , C- - controlo negativo PCR (sem DNA)).



Todas as famílias foram amplificadas correctamente e em quantidade suficiente para o processo seguinte de clonagem.

### **3.1.3 - Purificação e clonagem dos fragmentos correspondentes aos domínios VL de baço e medula óssea no vector pComb3X**

Os produtos de PCR amplificados foram purificados em gel de agarose e o DNA foi recuperado com recurso ao QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen). Da purificação dos domínios VL do baço foram recuperadas 76 µg DNA num volume total de 550 µl, e dos domínios VL da medula óssea foram recuperadas 44 µg DNA num volume total de 550 µl. Os géis das duas purificações foram os seguintes:

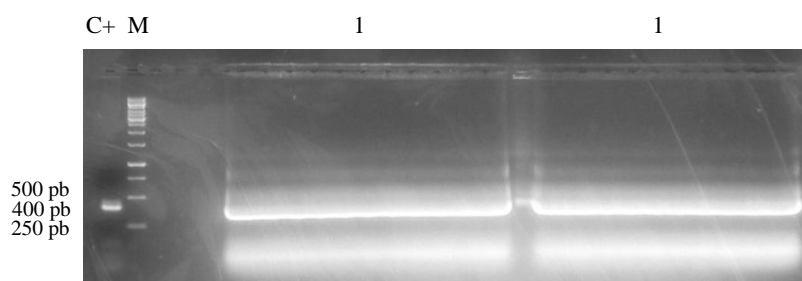


Fig.18- Gel de agarose a 2% (TAE 1x) da purificação dos fragmentos correspondentes aos domínios VL do baço amplificados por PCR; (C+ - controlo positivo de peso molecular, M – marcador de peso molecular, 1 – produtos PCR de VL do baço).

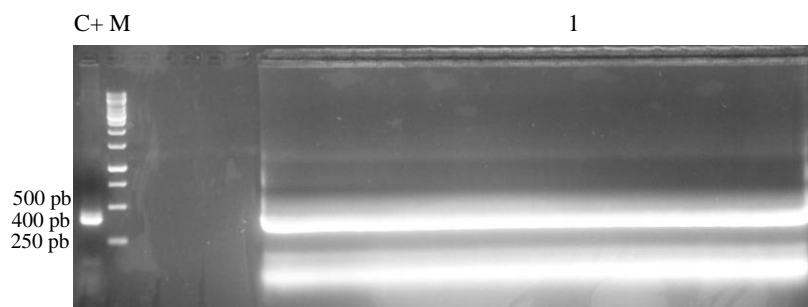


Fig.19 - Gel de agarose a 2% (TAE1x) da purificação dos fragmentos correspondentes aos domínios VL da medula óssea amplificados por PCR; (C+ - controlo positivo de peso molecular, M – marcador de peso molecular, 1 – produtos PCR de VL da medula óssea).

Após a purificação dos domínios VL, estes foram digeridos com a enzima SfiI e novamente purificados em gel de agarose. Foram recuperados 9,0 µg DNA num volume total de 50 µl para os domínios VL do baço e 9,6 µg DNA num volume de 50 µl para os domínios VL de medula óssea. O gel resultante da purificação foi o seguinte:

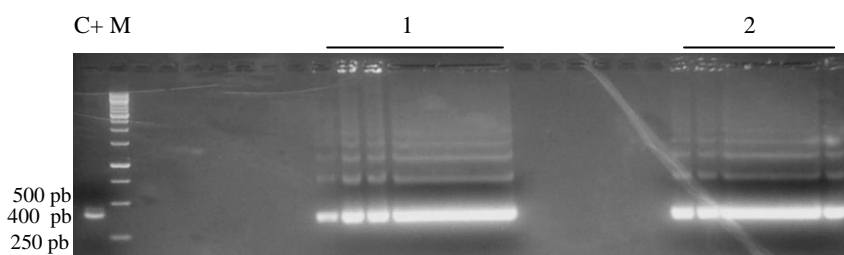


Fig.20 - Gel de agarose a 2% (TAE 1x) da purificação dos fragmentos correspondentes aos domínios VL do baço e medula óssea digeridos com SfiI (C+ - controlo positivo de peso molecular, M – marcador de peso molecular, 1 – domínios VL de medula óssea digeridos, 2 – domínios VL do baço digeridos).

Depois de digeridos e purificados, os domínios VL do baço e medula óssea foram clonados no vector pComb3X, igualmente digerido com Sfi. Para tal efectuaram-se ligações com diferentes proporções de vector e inserto (1:1, 1:3 e 1:6) que foram transformadas de modo a verificar com qual se obtinha maior quantidade de transformantes.

A razão de 1:3 foi a que proporcionou uma biblioteca com maior número de transformantes. A diversidade verificada para a biblioteca *naïve* de VL do baço foi de  $5.4 \times 10^5$  transformantes e a de VL de medula óssea foi de  $1.2 \times 10^6$  transformantes.

Após transformação das bibliotecas, procedeu-se à confirmação da eficiência das clonagens, mediante a verificação da presença de insertos, através de uma reacção de PCR. Analisaram-se dez clones de VL do baço e outros dez de VL de medula óssea. Apenas um dos clones de cada não apresentou banda, ou seja, apenas 10% dos clones das bibliotecas não têm o inserto clonado. O gel representativo do ensaio de PCR encontra-se de seguida:

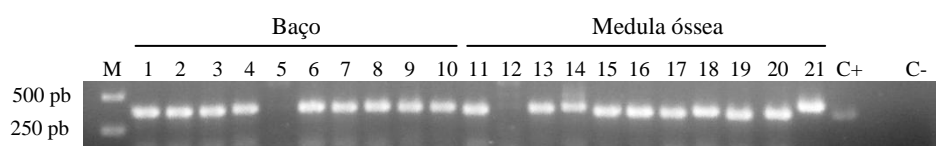


Fig.21 - Gel de agarose a 1,5% (TBE 0,5x) com os produtos PCR resultantes da amplificação dos insertos clonados (M – marcador de peso molecular, 1 a 10 – clones VL de baço, 11 a 21 – clones de VL de medula óssea, C+ - controlo positivo, C- -controlo negativo).

### 3.1.4 – Selecção de sdAb específicos contra a proteína gp41 e domínio HR1, por *phage display*

Após a construção das bibliotecas *naïve* de anticorpos VL procedeu-se à selecção dos anticorpos anti-gp41 e anti-HR1. Para tal efectuou-se a técnica de *phage display*. As duas bibliotecas dos domínios VL, do baço e medula óssea, foram transformadas em separado e foram utilizadas tanto para a selecção de anticorpos de domínio único contra a proteína gp41 como para o domínio HR1. Os fagos obtidos foram juntos no final de primeiro *panning*, para cada antígeno.

A tabela 13 apresenta os resultados e condições aplicadas em cada ciclo do *phage display* dos domínios VL contra a gp41.

Tabela 13 – Valores de *input* e *output* obtidos nos diferentes ciclos do *phage display* para a proteína gp41.

		1° Panning	2° Panning	3° Panning	4° Panning
<b>Input (fagos/ml)</b>	Medula + Baço	1.89x10 <sup>12</sup>	8.0x10 <sup>12</sup>	3.05x10 <sup>12</sup>	1.07x10 <sup>12</sup>
<b>Output (fagos/ml)</b>	gp41	10.4x10 <sup>5</sup>	8.0x10 <sup>3</sup>	2.32x10 <sup>5</sup>	7.4x10 <sup>4</sup>
<b>Condições</b>	-	Antígeno/poço - 1 µg Lavagem: 5x PBS TW 0.5%	Antígeno/poço - 1 µg Lavagem: 10x PBS TW 0.5%	Antígeno/poço - 1 µg Lavagem: 10x PBS TW 0.5%	Antígeno/poço - 1 µg Lavagem: 15x PBS TW 0.5%

Pelos valores acima representados, verificou-se uma diminuição da quantidade de fagos obtidos (*output*), do primeiro para o segundo *panning*, em que se aumentou a estringência com o aumento do número de lavagens. Esta diminuição voltou a observar-se na passagem do terceiro para o quarto *panning*, em que também se aumentou, em cinco vezes, o número de lavagens. A fig.22 representa a relação entre os *inputs* e os *outputs* obtidos do *phage display* efectuado contra a proteína gp41.

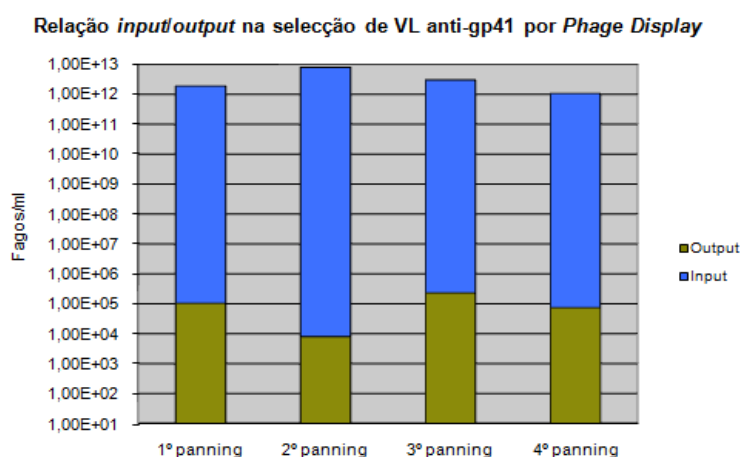


Fig.22 – Relação dos *inputs* e *outputs* nos quatro ciclos de *pannings* efectuados na selecção de anticorpos VL contra gp41.

A tabela 14 apresenta os resultados e as condições aplicadas em cada ciclo do *phage display* dos domínios VL contra o domínio HR1.

Tabela 14 – Valores de *input* e *output* obtidos nos diferentes ciclos do *phage display* para o domínio HR1.

		1° Panning	2° Panning	3° Panning	4° Panning
<b>Input</b> (fagos/ml)	Medula + Baço	1.89x10 <sup>12</sup>	6.0x10 <sup>12</sup>	3.83x10 <sup>12</sup>	1.48x10 <sup>12</sup>
<b>Output</b> (fagos/ml)	HR1	7.28x10 <sup>5</sup>	8.0x10 <sup>3</sup>	8.4x10 <sup>4</sup>	1.4x10 <sup>4</sup>
<b>Condições</b>	-	Antígeno/poço - 1 µg Lavagem: 5x PBS TW 0.5%	Antígeno/poço - 1 µg Lavagem: 10x PBS TW 0.5%	Antígeno/poço - 1 µg Lavagem: 10x PBS TW 0.5%	Antígeno/poço - 1 µg Lavagem: 15x PBS TW 0.5%

Mais uma vez, e à semelhança do que se verificou para a selecção de anticorpos contra a gp41, observou-se uma diminuição de fagos obtidos (*output*), do primeiro para o segundo *panning*, em que se aumentou a estringência com o aumento do número de lavagens. Esta diminuição voltou a observar-se na passagem do terceiro para o quarto *panning*, em que igualmente se aumentou a estringência. A relação entre os *inputs* e os *outputs* estão representados na figura 23.

**Relação *input/output* na selecção de VL anti-HR1 por *Phage Display***

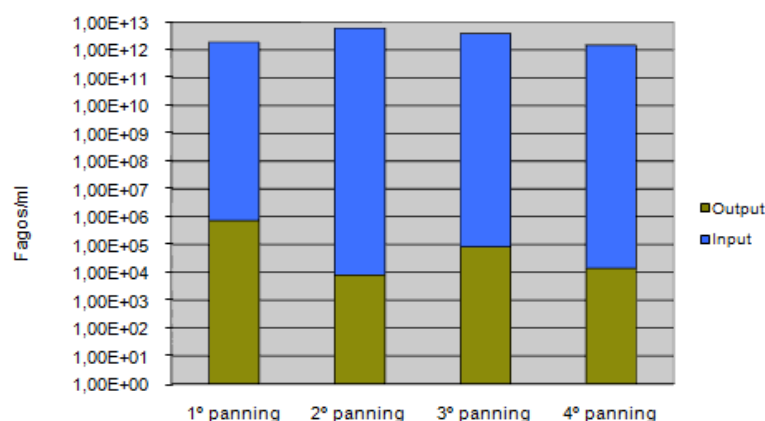


Fig.23 – Relação dos *inputs* e *outputs* nos quatro ciclos de *pannings* efectuados na selecção de anticorpos VL contra HR1.

### 3.2 - *Screening* e caracterização dos anticorpos de domínio único seleccionados contra a proteína gp41 e domínio HR1

#### 3.2.1 – Clonagem dos genes dos sdAb seleccionados contra a gp41 e HR1, por *phage display*, no vector pT7-PL

De modo a expressar e seleccionar os anticorpos anti-gp41 e HR1 após a técnica de *phage display*, o DNA correspondente aos domínios VL do quarto *panning* de selecção para cada molécula alvo foi clonado no vector pT7-PL.

Para tal, das bactérias guardadas do quarto *panning* extraiu-se DNA e digeriu-se com enzima SfiI de modo a isolar os genes que codificam para os domínios VL anti-gp41 e anti-HR1, com aproximadamente 400 pb. Os géis resultantes da purificação destes fragmentos foram os seguintes:

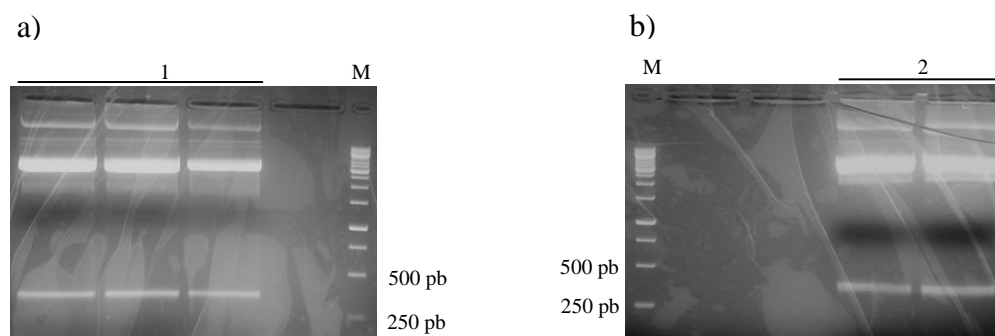


Fig.24 – Purificação dos anticorpos VL anti-gp41 e anti-HR1 digeridos com SfiI; a) Gel de agarose a 2% (TAE 1x) da purificação dos fragmentos correspondentes aos domínios VL anti-gp41 digeridos com SfiI; b) Gel de agarose a 2% (TAE 1x) da purificação dos fragmentos correspondentes aos domínios VL anti-HR1 digeridos com SfiI; (M – marcador de peso molecular, 1 – domínios VL anti-gp41 após digestão com SfiI, 2 - domínios VL anti-HR1 após digestão com SfiI).

Depois de digeridos e purificados, os anticorpos VL anti-gp41 e VL anti-HR1 foram clonados no vector pT7-PL, igualmente digerido com SfiI. Para verificação da

clonagem procedeu-se à confirmação da existência de insertos correspondentes aos genes dos anticorpos (aproximadamente 400 pb), através de uma reacção de PCR. Analisaram-se dez clones de VL anti-gp41 e dez de VL anti-HR1. Todos os clones testados apresentaram o gene clonado. O gel representativo do ensaio de PCR encontra-se de seguida:

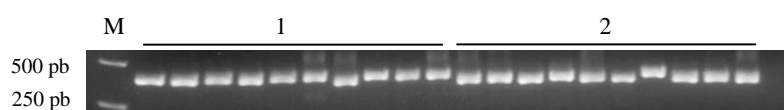


Fig.25 - Gel de agarose a 1,5% (TBE 0,5x) de confirmação de insertos nos clones obtidos da transformação dos VL anti-gp41 e anti-HR1 em *E. coli* BL21 (M – marcador de peso molecular, 1 – clones de VL anti-gp41, 2 – clones de VL anti-HR1, C- - controlo negativo PCR).

### **3.2.2 – Selecção de anticorpos específicos para a proteína gp41 e domínio HR1 com recurso ao sistema automatizado Hamilton**

Após clonagem no vector pT7-PL, procedeu-se à selecção dos anticorpos VL anti-gp41 e HR1 que apresentassem valores elevados de ligação e expressão/solubilidade. Esta selecção foi efectuada com recurso ao sistema automatizado da Hamilton (robot) tendo sido analisados simultaneamente 384 clones de cada. Os resultados obtidos através do robot para os 384 clones de VL anti-gp41 e anti-HR1 são os seguintes:

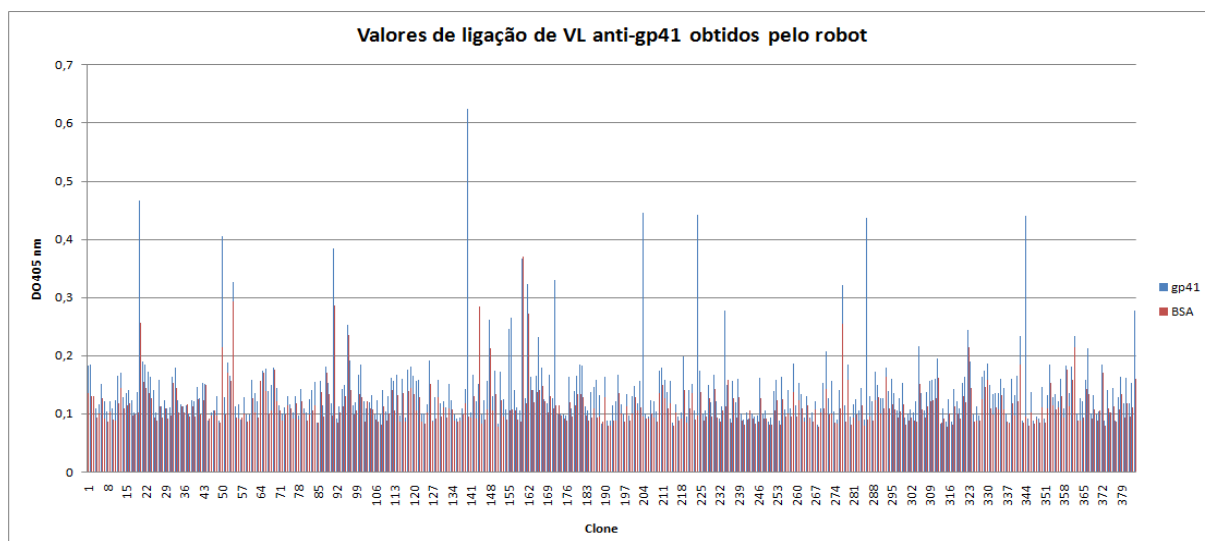


Fig.26 – Valores de ligação à gp41 e BSA, obtidos do robot, para os 384 clones analisados de VL anti-gp41 (azul – ligação dos anticorpos à gp41; vermelho – ligação dos anticorpos à BSA).

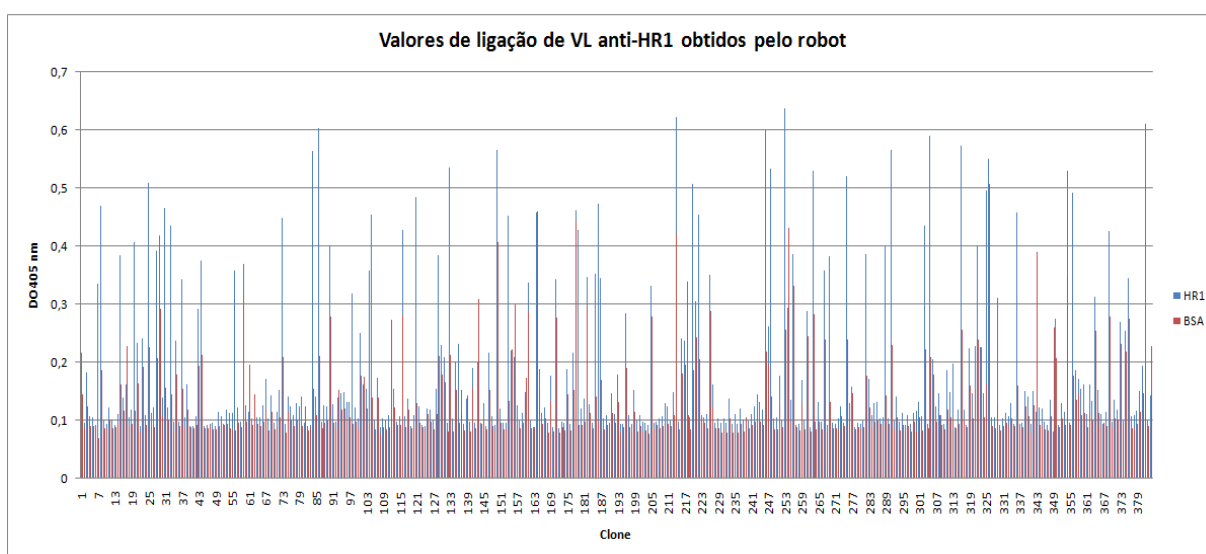


Fig.27 - Valores de ligação à gp41 e BSA, obtidos do robot, para os 384 clones analisados de VL anti-HR1 (azul – ligação dos anticorpos ao HR1; vermelho – ligação dos anticorpos à BSA).

Mediante a análise dos resultados foram seleccionados cinco clones de VL anti-gp41 ( $DO_{405nm} \text{ gp41} > 0,2$  e  $DO_{405nm} \text{ BSA} < 0,15$ ) e 36 clones de VL anti-HR1 ( $DO_{405nm} \text{ HR1} > 0,2$  e  $DO_{405nm} \text{ BSA} < 0,2$ ). A selecção dos clones foi, também, efectuada tendo



em conta os seus valores de expressão/solubilidade. Todos os clones seleccionados apresentaram níveis de expressão/solubilidade elevados ( $DO_{405nm} > 0,8$ ; dados não apresentados) e rendimentos superiores a 15 mg/ml.

### 3.2.3 – Confirmação da ligação à proteína alvo, dos clones seleccionados no robot

Depois de seleccionados os clones de entre os 384 clones testados, voltaram-se a confirmar os resultados obtidos e voltaram a seleccionar-se os clones com valores de ligação e expressão/solubilidade mais elevados. Para tal, efectuou-se um ensaio de ELISA de modo a avaliar a ligação à molécula alvo e BSA. Os resultados dos ensaios encontram-se representados nos gráficos seguintes:

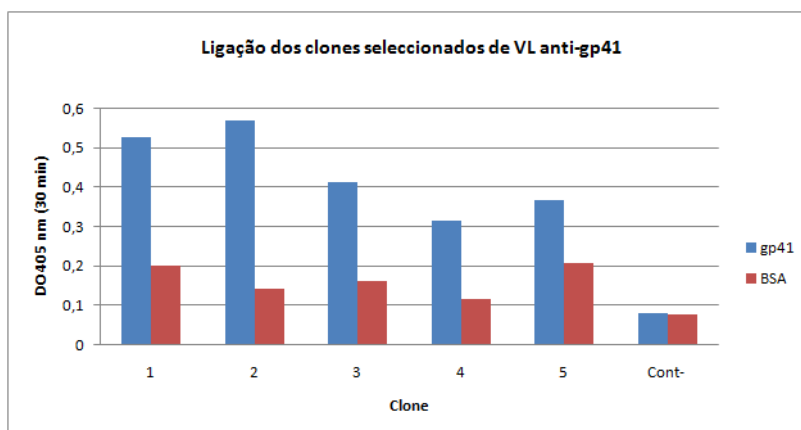


Fig.28 – Ensaio de ELISA para avaliação da ligação ao antígeno dos anticorpos VL anti-gp41 seleccionados (azul – ligação dos anticorpos à gp41; vermelho – ligação dos anticorpos à BSA; Cont- - extracto celular (*E. coli* BL21)).

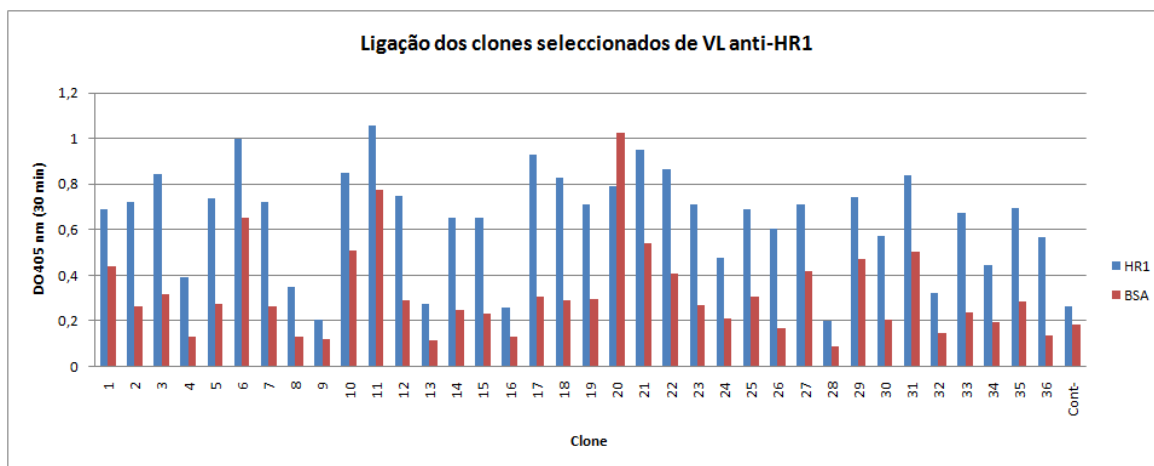


Fig.29 – Ensaio de ELISA para avaliação da ligação ao antigénio dos anticorpos VL anti-HR1 seleccionados (azul – ligação dos anticorpos ao HR1; vermelho – ligação dos anticorpos à BSA; Cont- - extracto celular (*E. coli* BL21)).

Da análise destes resultados foram escolhidos os clones que apresentassem valores mais altos de ligação à molécula alvo e valores mais baixos de ligação à BSA. Seleccionaram-se os cinco clones de VL anti-gp41 e 10 clones de VL anti-HR1 (clones 7, 14, 17, 18, 19, 23, 26, 30, 33 e 36).

### 3.2.4 – Ensaio de ligação à proteína gp41 e domínio HR1 dos anticorpos VL anti-gp41 e anti-HR1

Dos anticorpos seleccionados, foram feitos novos ensaios de ligação com os anticorpos de VL anti-gp41 e VL anti-HR1 seleccionados.

Além de se testarem os VL anti-gp41 contra a gp41 e os VL anti-HR1 contra o HR1 testou-se também a ligação dos VL anti-gp41 contra HR1 e os VL anti-HR1 contra gp41. Os ensaios foram efectuados em triplicado e os resultados encontram-se nas figuras seguintes, com a média e o desvio padrão obtidos para cada caso testado.

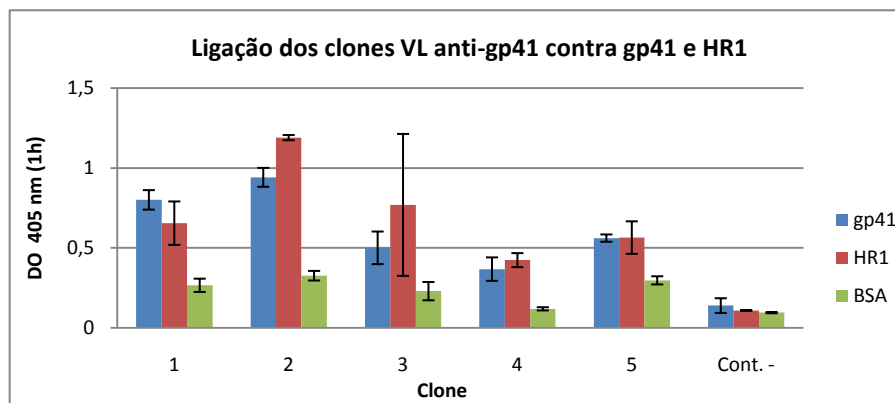


Fig.30 – Ensaio de ELISA para avaliação da ligação dos anticorpos VL anti-gp41 seleccionados contra a gp41, HR1 e BSA (azul – ligação dos anticorpos VL anti-gp41 à gp41; vermelho – ligação dos anticorpos VL anti-gp41 ao HR1; verde – ligação dos anticorpos VL à BSA; Cont- - extracto celular (*E. coli* BL21)).

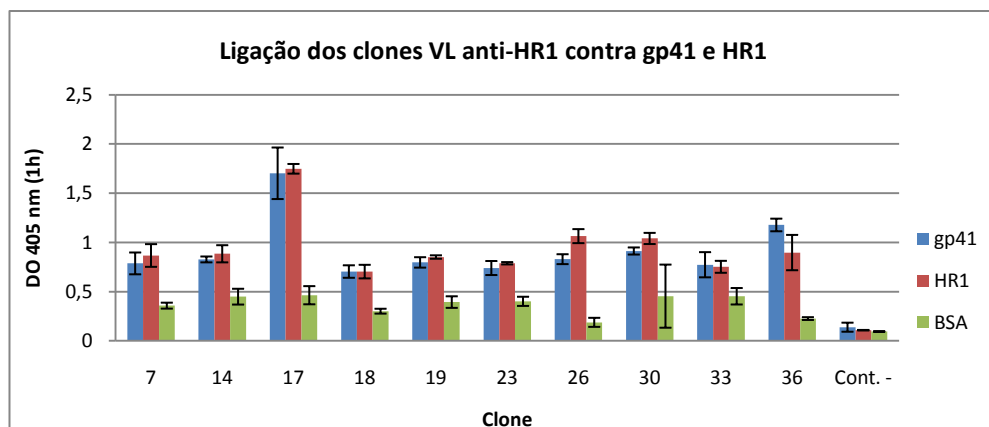


Fig.31 – Ensaio de ELISA para avaliação da ligação dos anticorpos VL anti-HR1 seleccionados contra a gp41, HR1 e BSA (azul – ligação dos anticorpos VL anti-HR1 à gp41; vermelho – ligação dos anticorpos VL anti-HR1 ao HR1; verde – ligação dos VL; Cont- - extracto celular (*E. coli* BL21)).

### 3.2.5 - Análise das sequências e determinação de homologies dos anticorpos VL anti-gp41 e VL anti-HR1 seleccionados

Os cinco clones VL anti-gp41 e os 10 de VL anti-HR1, analisados no ponto anterior, foram sequenciados e efectuada a análise de homologies por alinhamento das sequências aminoacídicas obtidas. A análise das sequências e das respectivas homologies são as seguintes:

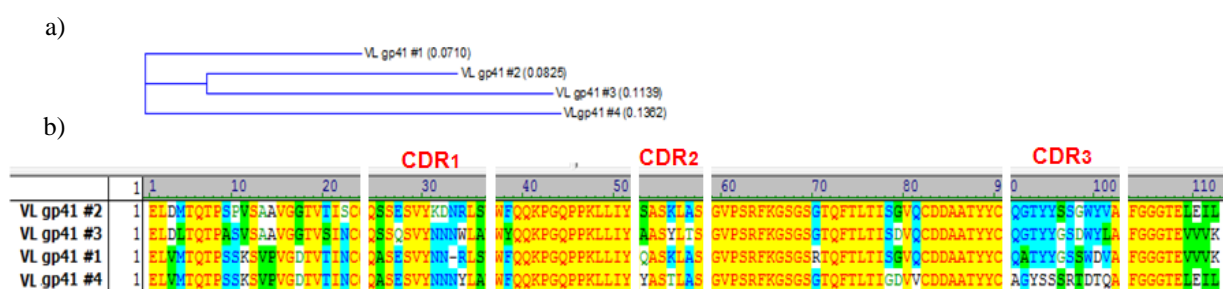


Fig.32 – Homologia entre as sequências aminoacídicas dos clones VL anti-gp41 obtidos; a)

cladograma obtido da análise de homologies entre os clones, b) alinhamento das sequências obtidas para cada clone.

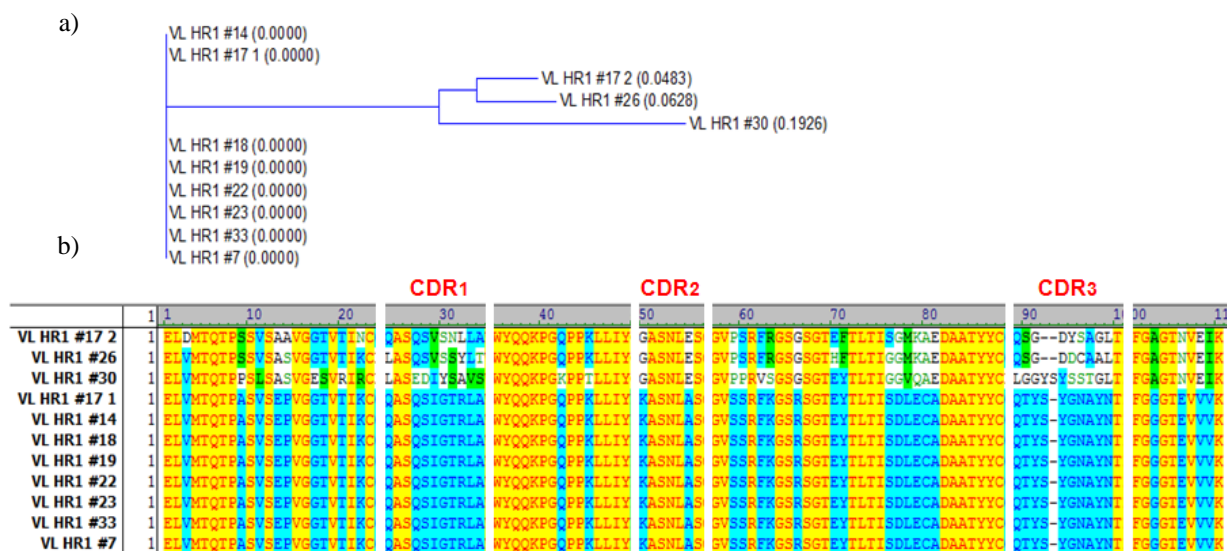


Fig.33 - Homologia entre as sequências aminoacídicas dos clones VL anti-HR1 obtidos; a)

cladograma obtido da análise de homologies entre os clones, b) alinhamento das sequências obtidas para cada clone.

Apenas o clone 5 de VL anti-gp41 não se encontra representado devido a problemas relacionados com a sequenciação.

Da análise das sequências verifica-se que, entre os clones de VL anti-gp41 existe uma grande variabilidade ao nível dos CDRs (fig.32). No que diz respeito aos clones VL anti-HR1, verificou-se a selecção predominante do mesmo clone (fig.33).

Ao serem analisadas as sequências, verificou-se que o clone 17 de VL anti-HR1 apresenta uma sequência com aproximadamente 800 pb comparativamente aos 400 pb verificados para um monómero, o que demonstra ser um dímero formado naturalmente. No esquema de homologias apresenta-se os dois monómeros separados, identificados como VL HR1 #17, 1 e 2.

Da análise de homologias foram seleccionados os quatro clones de VL anti-gp41 e os quatro clones diferentes de VL anti-HR1. Os clones seleccionados foram:

VL anti-gp41: clones 1, 2, 3 e 4

VL anti-HR1: clones 17, 19, 26 e 30

### **3.2.6 - Purificação dos quatro clones VL anti-gp41 e HR1 seleccionados**

Os quatro clones de VL anti-gp41 e anti-HR1 seleccionados foram purificados com recurso a colunas de afinidade de modo a efectuarem-se ensaios celulares de inibição do processo de fusão. Obtiveram-se rendimentos na ordem dos 50-100 µg/ml. O grau de pureza foi avaliado por SDS-PAGE e *western blot* (fig. 34 e 35).

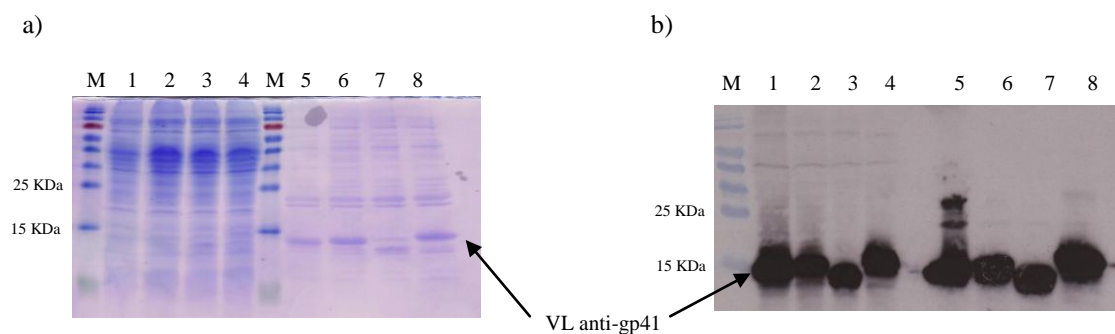


Fig.34 – Avaliação do grau de pureza dos clones VL anti-gp41 purificados; a) SDS-PAGE com coloração de coomassie dos clones VL anti-gp41 antes e depois da purificação; b) *Western blot* dos clones VL anti-gp41 antes e depois da purificação (M - marcador peso molecular, 1 – VL #1 antes da purificação, 2 – VL#2 antes da purificação, 3 – VL#3 antes da purificação, 4 – VL#4 antes da purificação, 5 – VL#1 depois da purificação, 6 - VL #2 depois da purificação, 7 – VL #3 depois da purificação, 8 – VL#4 depois da purificação).

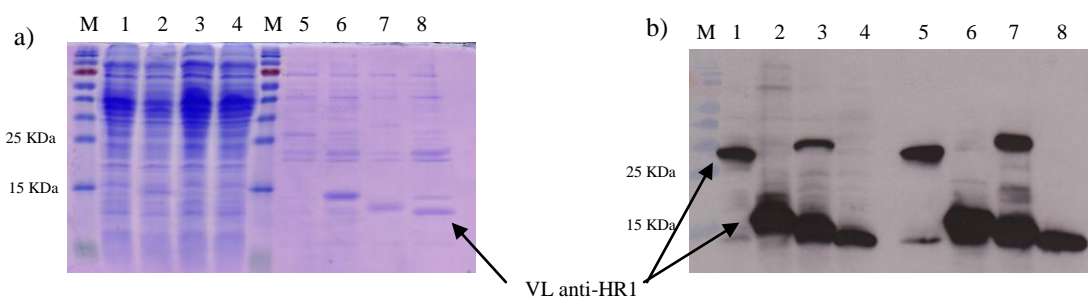


Fig.35 – Avaliação do grau de pureza dos clones VL anti-HR1 purificados; a) SDS-PAGE com coloração de coomassie dos clones VL anti-HR1 antes e depois da purificação; b) *Western blot* dos clones VL anti-HR1 antes e depois da purificação (M - marcador peso molecular, 1 – VL #17 antes da purificação, 2 – VL#19 antes da purificação, 3 – VL#26 antes da purificação, 4 – VL#30 antes da purificação, 5 – VL #17 depois da purificação, 6 - VL #19 depois da purificação, 7 – VL #26 depois da purificação, 8 – VL #30 depois da purificação).

### **3.3 – Ensaio celular de inibição do processo de fusão envelope viral/CD4 pelos VL anti-gp41 e anti-HR1**

Depois de produzidos, caracterizados e purificados, os VL anti-gp41 e anti-HR1 foram estudados ao nível da capacidade de inibição da fusão entre o envelope viral e o receptor CD4. Para tal, efectuou-se um ensaio celular envolvendo as células HeLa 243env, as células HeLa CD4 LTR- $\beta$ -Gal e os VL produzidos, tendo-se analisado o grau de inibição pela leitura colorimétrica da clivagem do CPRG pela  $\beta$ -galactosidase<sup>64</sup>. O CPRG apresenta coloração amarela mas o produto resultante da clivagem apresenta coloração vermelha (ver materiais e métodos). Esta alteração de cor foi medida espectrofotometricamente a 550nm. Quanto maior for o grau de inibição da fusão envelope viral/CD4 pelos VL menor será o valor de DO medido a 550nm. Como controlo positivo usou-se o péptido T20 (Roche) e como controlo negativo usou-se um anticorpo VL irrelevante. Os resultados apresentados nas figuras 36 e 37 representam a percentagem de fusão envelope/CD4 obtida para cada clone. Os valores obtidos para o ensaio com 0 nM de anticorpo foram normalizados para 100%.

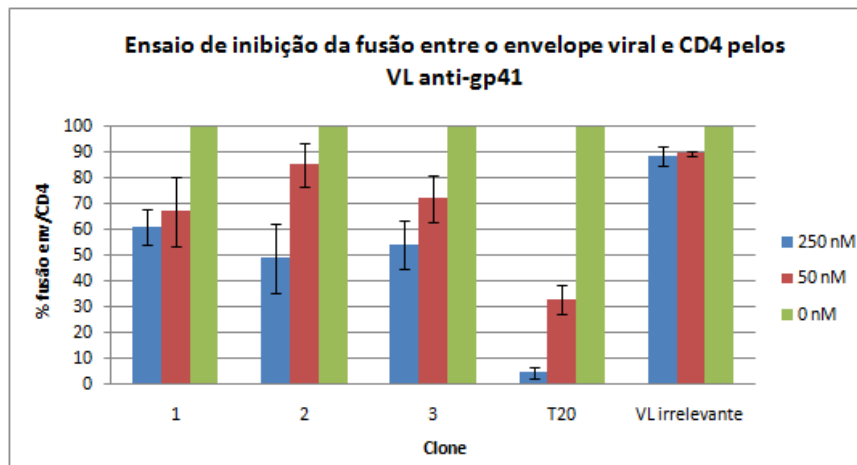


Fig.36 – Ensaio de inibição, pelos VL anti-gp41, do processo de fusão entre o envelope viral de VIH-1 expresso à superfície das células HeLa243env e o receptor CD4 expresso à superfície das células HeLa CD4 LTR- $\beta$ -Gal.

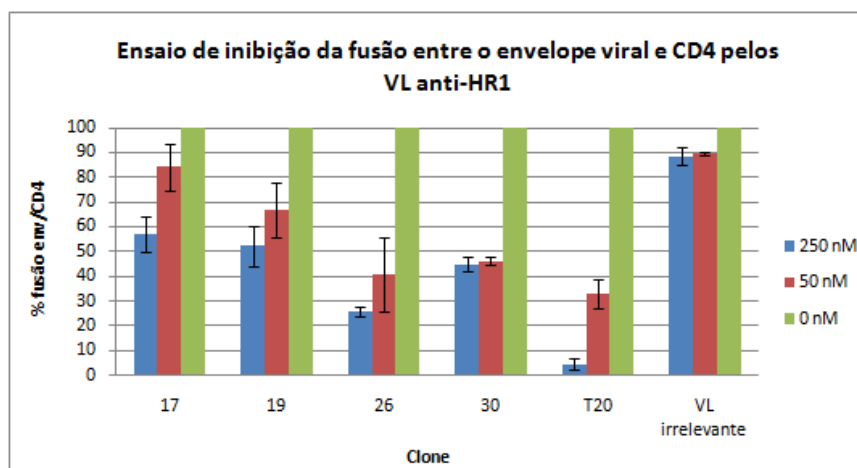


Fig.37 - Ensaio de inibição, pelos VL anti-HR1, do processo de fusão entre o envelope viral de VIH-1 expresso à superfície das células HeLa243env e o receptor CD4 expresso à superfície das células HeLa CD4 LTR- $\beta$ -Gal.



**Capítulo 4**  
**Discussão de resultados**

---

O trabalho apresentado teve como objectivo principal produzir anticorpos de domínio único que, pela sua ligação à glicoproteína gp41 ou domínio HR1, conseguissem bloquear o processo de entrada/fusão de VIH-1 na célula hospedeira. Este trabalho foi dividido em três etapas que serão discutidas seguidamente.

#### **4.1 – Construção de bibliotecas *naïve* de anticorpos VL e selecção dos anticorpos específicos contra a proteína gp41 e domínio HR1 por *phage display***

O primeiro objectivo deste trabalho consistiu na construção de uma biblioteca *naïve* de anticorpos VL. O motivo pelo qual se optou por construir uma biblioteca *naïve* incide sobre o facto de estas permitirem um rápido isolamento de anticorpos com afinidade para as moléculas alvo. Uma vez que não é necessária a imunização do animal por serem consideradas bibliotecas universais, podem ser seleccionados anticorpos contra qualquer proteína. São uma mais-valia uma vez que podem ser utilizadas, futuramente, no isolamento de anticorpos contra outros alvos, nomeadamente, proteínas pouco imunogénicas, tóxicas ou pertencentes ao próprio organismo<sup>59</sup>.

O modelo animal escolhido para a construção das bibliotecas foi o coelho. Sabe-se que os coelhos produzem anticorpos contra muitos antígenos que não são imunogénicos em ratinhos e que estes anticorpos são, geralmente, de elevada estabilidade e afinidade<sup>65</sup>.

Para construir as bibliotecas *naïve* de anticorpos foi necessário obter o mRNA do coelho e sintetizar o respectivo cDNA. O mRNA foi obtido a partir do baço e da medula óssea uma vez que são órgãos onde existe maior quantidade de linfócitos B, produtores de anticorpos. Utilizou-se a medula óssea porque se trata de um órgão

hematopoiético, produtor, entre outras células, de linfócitos B. É neste órgão que se originam e desenvolvem as células produtoras de anticorpos, ou seja, as linfócitos B *naïve*. Apesar de serem bibliotecas *naïve*, optou-se por partir também de tecido do baço para recolha de mRNA para se obter uma biblioteca com maior diversidade. O baço porque é o órgão onde se dá o contacto das células B com o antígeno com a sua consequente diferenciação e expansão<sup>44</sup>.

Os anticorpos de domínio único podem ser domínios VL ou VH de anticorpos monoclonais. No trabalho laboratorial deste projecto foram amplificados tanto os genes correspondentes aos domínios VL como VH. No entanto, optou-se por seleccionar anticorpos oriundos apenas das bibliotecas VL. Os domínios VL de coelho apresentam-se, normalmente, mais estáveis comparativamente aos domínios VH<sup>66</sup>.

Os fragmentos de anticorpos VL foram amplificados por intermédio de conjuntos de *primers* já desenhados, constantes da literatura, de forma a amplificar todas as famílias VL disponíveis no repertório de anticorpos *naïve* de coelho<sup>59</sup>. Pela análise das fig.17 e 18, verifica-se que todas as famílias VL foram amplificadas. Recorrendo a outros trabalhos efectuados, nomeadamente com bibliotecas imunizadas, verifica-se que as famílias VL k3 e  $\lambda$  eram pouco amplificadas, chegando a não se conseguir amplificar nenhuma delas<sup>67</sup>. Seria, portanto, de esperar a possibilidade de não se conseguir amplificar tanto as três famílias k3 como também a  $\lambda$ . No entanto, todas as famílias foram amplificadas, contribuindo assim para uma maior diversidade das bibliotecas *naïve* construídas.

As bibliotecas *naïve* de anticorpos VL de baço e medula óssea foram construídas separadamente. Uma vez que ambas apresentaram diversidades semelhantes, as duas foram juntas no início do *phage display* de modo a obter maior diversidade e assim aumentar a probabilidade de seleccionar anticorpos contra as moléculas alvo, neste

caso, gp41 e HR1. Optou-se, também, por seleccionar anticorpos contra o domínio HR1 uma vez que é uma das regiões da proteína gp41 mais importante no processo de fusão. É uma região conservada que poderá estar mais acessível, durante o processo de fusão, ao alcance de pequenas moléculas comparativamente a outras regiões do ectodomínio da proteína gp41.

Depois de construídas as bibliotecas, o objectivo seguinte consistiu em seleccionar os anticorpos que apresentassem especificidade para a gp41 e HR1, por *phage display*. As condições de estringência aplicadas em todo o processo resultaram de um compromisso entre a tentativa de isolamento de anticorpos específicos para as moléculas alvo e o facto de derivarem de bibliotecas *naïve*, o que implica uma menor afinidade. Deste modo, manteve-se constante a quantidade de antígeno imobilizado na placa tendo-se alterado, gradualmente, e consoante os resultados, o número de lavagens em cada ciclo efectuado. A percentagem de Tween 20 no tampão de lavagem foi, igualmente, mantida constante, a 0,5%. Nestas condições e tanto no processo de selecção de anticorpos contra a gp41 como HR1, após o primeiro *panning* (cinco lavagens) verificou-se uma diminuição de fagos específicos recuperados. Após o segundo *panning*, em que se continuou a aumentar a estringência (10 lavagens efectuadas), voltou a verificar-se uma diminuição da quantidade de fagos recuperados o que demonstra que o aumento do número de lavagens promoveu a eliminação de fagos que até então se tinham mantido ligados mas que com condições mais desfavoráveis, acabaram por ser eliminados devido à fraca ligação. No terceiro *panning*, e porque estamos a trabalhar com anticorpos de uma biblioteca *naïve* que não apresentam afinidade tão elevada, decidiu manter-se inalterado o nível de estringência, mantendo o mesmo número de lavagens efectuadas no *panning* anterior. O resultado verificado foi um enriquecimento dos fagos específicos, recolhidos até então, ou seja, verificou-se um

aumento do número de fagos recuperados após o terceiro *panning*. Tal facto indica que os fagos obtidos apresentam elevada actividade/ligação, tanto para a gp41 como HR1. No ciclo de selecção seguinte voltou a aumentar-se a estringência, aumentando para 15 o número de lavagens. Tal facto fez diminuir o número de fagos recuperados, não tendo, no entanto, sido uma diminuição tão acentuada. Leva-nos, então, a considerar que os anticorpos expostos à superfície dos fagos recuperados no final do processo de *phage display* apresentam elevada ligação às moléculas em estudo.

As condições de estringência aplicadas neste processo de *phage display* não diferem muito das condições habitualmente escolhidas para a selecção de anticorpos provenientes de uma biblioteca imunizada. Para bibliotecas imunizadas ter-se-ia alterado, também, a quantidade de antígeno imobilizado na placa. Uma vez que se aplicaram condições particularmente agressivas na selecção dos anticorpos provenientes das bibliotecas *naïve* e se obteve um perfil semelhante à selecção de anticorpos de bibliotecas imunizadas<sup>59</sup>, pode considerar-se que a *pool* de anticorpos recuperados apresenta especificidade para gp41/HR1, tendo o processo de *phage display* sido bem sucedido.

Perante os resultados e discussão apresentada podemos afirmar que as bibliotecas *naïve* de anticorpos VL foram construídas com sucesso e que, por intermédio da técnica de *phage display*, se conseguiu isolar uma *pool* de anticorpos, a partir das bibliotecas construídas, específicos para a proteína gp41 e domínio HR1.

## **4.2 - *Screening* e caracterização dos anticorpos de domínio único seleccionados contra a gp41 e HR1**

Após obtenção de uma *pool* de anticorpos específicos para as moléculas alvo (gp41 e HR1), o objectivo seguinte consistiu em seleccionar, de entre estes, os anticorpos de maior actividade/ligação, e caracteriza-los. Para tal, os seus genes foram clonados no vector pT7-PL de modo a poderem ser expressos, seleccionados e caracterizados.

A *pool* de clones obtidos foi, então, sujeita a um processo de selecção com vista a recuperar, de entre os muitos clones obtidos do *phage display*, os que apresentavam maiores valores de ligação e expressão/solubilidade para a molécula alvo. Esta selecção foi efectuada com recurso ao sistema automatizado Hamilton – Microlab Star que permitiu a avaliação de 384 clones em simultâneo. Neste processo foi avaliada, não só a ligação do anticorpo à respectiva molécula alvo, como também a sua expressão/solubilidade. De entre os analisados, mediante ensaio de ELISA, foram escolhidos os que apresentaram valores elevados na ligação à molécula alvo, valores baixos na ligação à BSA e valores altos de expressão/solubilidade. Os resultados obtidos foram diferentes, no que diz respeito à gp41 e HR1. Apenas se seleccionaram cinco anticorpos contra a gp41 comparativamente aos 36 seleccionados contra o HR1. Estes resultados podem estar relacionados com a natureza e conformação das moléculas alvo utilizadas. A gp41 é uma glicoproteína com a sua estrutura conformacional específica e o domínio HR1 é um péptido, de conformação linear e de menores dimensões.

Após selecção dos clones VL anti-gp41 e HR1, voltaram a repetir-se ensaios de ELISA, não só para confirmar os resultados obtidos no sistema automatizado, mas

também para restringir mais o número de clones e seleccionar apenas os que apresentassem melhor especificidade e expressão/solubilidade. Da análise resultante confirmam-se os resultados obtidos pelo sistema automatizado. Os clones seleccionados continuavam a mostrar elevada ligação ao antígeno e bom nível de expressão/solubilidade.

Confirmados os resultados, voltaram a fazer-se novos ensaios de ELISA. Estes ensaios decorreram de um modo mais elaborado, tendo-se testado os anticorpos VL anti-gp41 não só contra a própria gp41 como também contra o domínio HR1 e também os anticorpos VL anti-HR1 contra o próprio antígeno e gp41. Pela análise dos resultados obtidos para os clones VL anti-gp41 contra a gp41 verifica-se que os clones 1, 2 e 5 são os que apresentam melhor ligação ao antígeno. Quando o mesmo ensaio é realizado contra o domínio HR1, verifica-se que os clones apresentam valores semelhantes aos obtidos para a gp41. Tal facto pode indicar que os locais de ligação na gp41, destes clones, possam estar localizados na região do HR1. No entanto, o clone 2 apresenta valores de ligação ao HR1 um pouco mais elevados que os da gp41. Estes valores podem indicar que o local de ligação do clone 2 possa estar mais exposto na estrutura conformacional da proteína gp41 recombinante relativamente aos epítomos dos restantes clones. Estes resultados permitem prever um maior potencial do clone 2 VL anti-gp41 na inibição do processo de fusão das membranas viral e celular.

Da análise dos resultados obtidos para os clones VL anti-HR1 contra a HR1 verificou-se que os clones 7, 14, 17, 19, 26, 30 e 36 apresentaram valores elevados de ligação ao antígeno. Quando analisados os resultados de ligação destes mesmos clones contra a gp41, verifica-se que o sinal se mantém elevado e equiparado aos valores obtidos para a ligação ao HR1. Tais resultados permitem concluir que, qualquer que seja o epítomo de ligação no HR1 reconhecido pelos clones VL anti-HR1 é, também,

reconhecido na estrutura conformacional da gp41 recombinante. Estes resultados são importantes na medida que se seleccionaram anticorpos VL anti-HR1 que têm a capacidade de se ligar à estrutura conformacional da gp41 recombinante, indicando que os locais de ligação possam, também, estar acessíveis na estrutura nativa da proteína. De igual modo pode prever-se que, pela sua capacidade de ligação à estrutura conformacional da gp41, estes clones sejam potenciais inibidores do processo de fusão.

Os clones estudados foram sequenciados tendo-se analisado a homologia entre eles. Constatou-se que todos os clones VL anti-gp41 analisados são diferentes mas que há grande percentagem de clones VL anti-HR1 iguais. Podemos concluir que durante as várias selecções de anticorpos VL anti-HR1 se seleccionou predominantemente o mesmo clone contrariamente ao verificado para os VL anti-gp41. Curiosamente, constatou-se que o clone 17 VL anti-HR1, que nos ensaios apresentou os valores mais elevados de ligação às moléculas alvo, é na realidade um dímero, formado naturalmente, sendo composto por dois monómeros diferentes entre si. Tal facto leva-nos a inferir que, apesar de ser um dímero, as suas dimensões não impedem a ligação ao epítopo, mesmo na estrutura conformacional da gp41. Por outro lado, este dímero é constituído por dois monómeros diferentes o que nos leva a colocar a hipótese de ambos os monómeros se estarem a ligar à estrutura da gp41 mas em locais diferentes, podendo influenciar positivamente a inibição do processo de fusão. De referir, também, que um dos monómeros é igual ao anticorpo que foi predominantemente seleccionado nos ensaios efectuados.

Dos clones estudados foram seleccionados os quatro VL anti-gp41 (clones 1, 2, 3 e 4) e quatro clones de anti-HR1 (clones 17, 19, 26 e 30) a fim de verificar a sua capacidade de inibição do processo de fusão.



### **4.3 – Ensaio celular de inibição da fusão envelope viral/CD4 pelos VL anti-gp41 e anti-HR1**

Uma vez seleccionados os quatro anticorpos VL anti-gp41 e anti-HR1 e depois de caracterizados, foi realizado um ensaio celular de modo a avaliar a capacidade destes anticorpos em bloquear a fusão do envelope viral com o receptor CD4. Para tal foram utilizadas as células HeLa243env que expressam à sua superfície o envelope de VIH-1 e células HeLa CD4 LTR- $\beta$ -Gal. As HeLa243env foram incubadas com os VL anti-gp41 e anti-HR1 que posteriormente foram adicionados às células HeLa CD4 LTR- $\beta$ -Gal. No caso de haver fusão, verifica-se a expressão da  $\beta$ -galactosidase pelas células HeLa CD4 LTR- $\beta$ -Gal. A expressão é detectada pela clivagem do substrato CPRG que muda da cor amarela para vermelha, lido a 550nm.

No que diz respeito aos resultados referentes aos VL anti-gp41 verificam-se percentagens de fusão mais baixas à medida que se aumenta a concentração de anticorpo testada o que demonstra uma inibição do processo de fusão pela acção dos anticorpos VL anti-gp41. No que diz respeito aos resultados referentes aos VL anti-HR1, excepto para o clone 30 que manteve os valores de fusão idênticos para as duas concentrações, em todos os outros se verificou uma diminuição da percentagem de fusão envelope/CD4 com o aumento da concentração de VL anti-HR1 adicionada. Estes ensaios celulares permitem-nos inferir que os locais de ligação dos VL anti-HR1 se encontram expostos durante o processo de fusão e que os mesmos anticorpos se conseguem ligar eficientemente, inibindo o processo de fusão. São de realçar percentagens de fusão mais baixas para os clones 26 e 30 comparativamente aos clones 17 e 19. Observando os resultados obtidos para o T20, verifica-se uma inibição do processo de fusão quase completa com uma concentração de 250nM. Comparando as

percentagens de fusão obtidas pela acção dos anticorpos VL anti-gp41 e HR1 com os valores obtidos para o T20 verificam-se percentagens de inibição na ordem dos 50%. Estes resultados são bastante promissores visto tratarem-se de ensaios preliminares e visto estarem-se a comparar valores obtidos para os anticorpos seleccionados com os obtidos para um antirretroviral existente, actualmente, no mercado.

## **Capítulo 5**

# **Conclusão**

---

Este projecto teve como principal objectivo seleccionar anticorpos de domínio único específicos para a proteína transmembranar gp41 e para o domínio HR1, a partir de uma biblioteca VL *naïve* de anticorpos. O intuito consistiu em produzir anticorpos de domínio único que, pelas suas reduzidas dimensões, se conseguissem ligar mais facilmente a regiões inacessíveis da proteína gp41 bloqueando, assim, o processo de fusão, impedindo a entrada do vírus na célula.

Para tal construíram-se bibliotecas *naïve* de anticorpos VL de coelho e procedeu-se à identificação dos anticorpos específicos para a proteína gp41 e domínio HR1 com recurso à técnica de *phage display*. Os perfis obtidos dos *phage display* efectuados contra a gp41 e HR1 foram coerentes relativamente às condições aplicadas em cada selecção. Pode, então, considerar-se que os anticorpos recuperados apresentavam especificidade tanto para a proteína gp41 como para o domínio /HR1, tendo o processo de *phage display* sido bem sucedido.

Procedeu-se, posteriormente, à selecção e caracterização dos anticorpos obtidos, tendo-se efectuado ensaios de especificidade, expressão/solubilidade e à purificação dos VL anti-gp41 e anti-HR1 seleccionados. A selecção foi efectuada através do sistema automatizado Hamilton – Microlab Star que permitiu avaliar 384 clones em simultâneo. Neste processo foi avaliada, não só a ligação do anticorpo à respectiva molécula alvo, como também a sua expressão. Foram seleccionados cinco anticorpos contra a proteína gp41 e 36 contra o domínio HR1. Depois da selecção, foram realizados ensaios mais específicos de ligação dos clones. Da ligação dos VL anti-gp41 à própria proteína e ao domínio HR1 verificou-se que os locais de ligação destes clones na gp41 podem corresponder à região do HR1. Da ligação dos VL anti-HR1 à proteína gp41 e ao próprio HR1 verificou-se que qualquer que fosse o local de ligação na região do HR1,

reconhecido pelos clones VL anti-HR1 é, também, reconhecido pelos mesmos na estrutura conformacional da gp41 recombinante.

Os clones estudados foram, posteriormente, sequenciados tendo-se analisado a homologia entre eles. Constatou-se que todos os clones VL anti-gp41 analisados são diferentes mas que grande parte dos clones VL anti-HR1 são iguais. Existem apenas quatro clones diferentes uma vez que se seleccionou, predominantemente, o mesmo clone. Verificou-se, também, que o clone 17, que apresentou valores elevados de ligação ao HR1 é um dímero, formado naturalmente.

Dos clones estudados foram seleccionados quatro, tanto de VL anti-gp41 (clones 1, 2, 3 e 4) como anti-HR1 (clones 17, 19, 26 e 30) para ensaios celulares, com o intuito de verificar a capacidade de inibição da fusão entre o envelope viral e o receptor CD4. Verificou-se, para a maior parte dos clones, uma diminuição da fusão envelope/CD4 com o aumento da concentração de VL adicionada. Tal facto sugere que os locais de ligação dos anticorpos seleccionados à proteína gp41 e ao domínio HR1 se encontram acessíveis, mesmo que temporariamente, e que os anticorpos conseguem ligar-se eficientemente, inibindo o processo de fusão.

Pode concluir-se, portanto, que os anticorpos seleccionados neste trabalho são potenciais inibidores do processo de fusão podendo eventualmente ser aplicados na terapêutica anti-retrovírica. Podem também ser utilizados no estudo da proteína gp41 a nível conformacional, no seu mapeamento e no estudo de interacções de modo a melhor compreender o processo de fusão. É, também, de referir que se construiu com sucesso uma biblioteca *naïve*, passível de ser utilizada na selecção de anticorpos contra qualquer outro alvo, sendo uma mais-valia para a investigação e para a empresa Technophage SA.

**Capítulo 6**  
**Perspectivas futuras**

---

Apesar dos resultados promissores que se obtiveram com a realização deste projecto, seria importante efectuar mais estudos não só para caracterização dos anticorpos seleccionados como também para obtenção de mais dados relativos à ligação dos anticorpos à molécula alvo, à inibição da fusão envelope viral/CD4 e inibição da infecção por VIH-1.

No contexto da caracterização dos anticorpos será importante determinar a afinidade dos anticorpos pela obtenção das constantes de associação e dissociação por Biacore, o mapeamento das interacções epitopo-paratopo de modo a determinar quais os locais na molécula alvo onde se ligam os anticorpos seleccionados e verificar que função apresentam no processo de fusão. Uma vez que se obteve um dímero (formado espontaneamente) será interessante compreender qual o comportamento do dímero VL anti-HR1 #17 na presença do antigénio, que monómero é responsável pela ligação e estabilidade e de que modo interage com a molécula alvo no processo de fusão.

No que diz respeito às características dos anticorpos, estas poderiam ser melhoradas, nomeadamente aumentando o tempo de meia vida recorrendo à peguilação, pela formação de anticorpos biespecíficos ou pela clonagem do anticorpo em fusão com domínios de ligação à albumina. Será, também, importante proceder à maturação da afinidade efectuando mutações pontuais nas regiões hipervariáveis dos anticorpos (CDR1, CDR2, CDR3) de modo a aumentar a afinidade dos VL anti-gp41 e anti-HR1 seleccionados. Será, também, importante efectuar ensaios de ELISA de competição com a proteína gp41 e HR1 para melhor perceber os locais de ligação dos anticorpos seleccionados.

No que diz respeito ao efeito dos anticorpos no processo de fusão será importante efectuar ensaios de verificação da capacidade de inibição da infecciosidade por VIH-1, efectuando ensaios celulares utilizando como modelo viral o clone NL4-3 de

VIH-1. Neste contexto, será igualmente importante efectuar ensaios de inibição da infecciosidade por VIH-1 recorrendo a células primárias e a estirpes de VIH-1 que existam em circulação nas diferentes regiões geográficas.



## **Capítulo 7**

# **Bibliografía**

---

1. Gallo RC, Montagnier L. Retrospective: The discovery of HIV as the cause of AIDS. *New Engl J Med* 2003;349:2283-5.
2. Clavel F, Guetard D, Brun-Vezinet F, *et al.* Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 1986;233:343-6.
3. Clavel F, Mansinho K, Chamaret S, *et al.* Human immunodeficiency virus type 2 infection associated with AIDS in West Africa. *N Engl J Med* 1987;316:1180-5.
4. Barresinoussi F, Chermann JC, Rey F, *et al.* Isolation of a T-Lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune-deficiency syndrome (Aids). *Science* 1983;220:868-71.
5. Taylor BS, Sobieszczyk ME, McCutchan FE, Hammer SM. The challenge of HIV-1 subtype diversity. *N Engl J Med* 2008;358:1590-602.
6. Kiwanuka N, Laeyendecker O, Robb M, *et al.* Effect of human immunodeficiency virus Type 1 (HIV-1) subtype on disease progression in persons from Rakai, Uganda, with incident HIV-1 infection. *J Infect Dis* 2008;197:707-13.
7. Stebbing J, Gazzard B, Douek DC. Mechanisms of disease - Where does HIV live? *New Engl J Med* 2004;350:1872-80.
8. Vergne L, Bourgeois A, Mpoudi-Ngole E, *et al.* Biological and genetic characteristics of HIV infections in Cameroon reveals dual group M and O infections and a correlation between SI-inducing phenotype of the predominant CRF02\_AG variant and disease stage. *Virology* 2003;310:254-66.
9. Robinson HL. New hope for an AIDS vaccine. *Nat Rev Immunol* 2002;2:239-50.
10. UNAIDS. UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2010; 2010.
11. Haseltine WA. Molecular biology of the human immunodeficiency virus type 1. *FASEB J* 1991;5:2349-60.
12. Song L, Sun ZY, Coleman KE, *et al.* Broadly neutralizing anti-HIV-1 antibodies disrupt a hinge-related function of gp41 at the membrane interface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:9057-62.
13. Costin JM. Cytopathic mechanisms of HIV-1. *Virol J* 2007;4:100.
14. Frankel AD, Young JA. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem* 1998;67:1-25.
15. Neira JL. The capsid protein of human immunodeficiency virus: designing inhibitors of capsid assembly. *FEBS J* 2009;276:6110-7.

16. Peterlin BM, Trono D. Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication. *Nat Rev Immunol* 2003;3:97-107.
17. Freed EO, Englund G, Martin MA. Role of the basic domain of human immunodeficiency virus type 1 matrix in macrophage infection. *J Virol* 1995;69:3949-54.
18. Benaroch P, Billard E, Gaudin R, Schindler M, Jouve M. HIV-1 assembly in macrophages. *Retrovirology* 2010;7:29.
19. Freed EO. HIV-1 replication. *Somat Cell Mol Genet* 2001;26:13-33.
20. Turner BG, Summers MF. Structural biology of HIV. *J Mol Biol* 1999;285:1-32.
21. Doms RW. Unwelcome guests with master keys: how HIV enters cells and how it can be stopped. *Top HIV Med* 2004;12:100-3.
22. Wainberg MA, Jeang KT. 25 years of HIV-1 research - progress and perspectives. *BMC Med* 2008;6:31.
23. Tazi J, Bakkour N, Marchand V, Ayadi L, Aboufirassi A, Branlant C. Alternative splicing: regulation of HIV-1 multiplication as a target for therapeutic action. *Febs Journal* 2010;277:867-76.
24. Menendez-Arias L. Molecular basis of human immunodeficiency virus drug resistance: an update. *Antiviral Res* 2010;85:210-31.
25. Maeda K, Mitsuya H. Development of therapeutics for AIDS: structure-based molecular targeting. *Tuberculosis (Edinb)* 2007;87 Suppl 1:S31-4.
26. Saag MS, Kilby JM. HIV-1 and HAART: a time to cure, a time to kill. *Nat Med* 1999;5:609-11.
27. Este JA, Cihlar T. Current status and challenges of antiretroviral research and therapy. *Antiviral Res* 2010;85:25-33.
28. Dorr P, Westby M, Dobbs S, *et al.* Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity. *Antimicrob Agents Ch* 2005;49:4721-32.
29. Menendez-Arias L. Targeting HIV: antiretroviral therapy and development of drug resistance. *Trends Pharmacol Sci* 2002;23:381-8.
30. Adamson CS, Freed EO. Recent progress in antiretrovirals--lessons from resistance. *Drug Discov Today* 2008;13:424-32.
31. Eckert DM, Kim PS. Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Annu Rev Biochem* 2001;70:777-810.

32. O'Hara BM, Olson WC. HIV entry inhibitors in clinical development. *Curr Opin Pharmacol* 2002;2:523-8.
33. MacArthur RD, Novak RM. Reviews of anti-infective agents: maraviroc: the first of a new class of antiretroviral agents. *Clin Infect Dis* 2008;47:236-41.
34. Bar S, Alizon M. Role of the ectodomain of the gp41 transmembrane envelope protein of human immunodeficiency virus type 1 in late steps of the membrane fusion process. *J Virol* 2004;78:811-20.
35. Delcroix-Genete D, Quan PL, Roger MG, Hazan U, Nisole S, Rousseau C. Antiviral properties of two trimeric recombinant gp41 proteins. *Retrovirology* 2006;3:16.
36. Chan DC, Kim PS. HIV entry and its inhibition. *Cell* 1998;93:681-4.
37. Montero M, van Houten NE, Wang X, Scott JK. The membrane-proximal external region of the human immunodeficiency virus type 1 envelope: dominant site of antibody neutralization and target for vaccine design. *Microbiol Mol Biol Rev* 2008;72:54-84, table of contents.
38. Salzwedel K, West JT, Hunter E. A conserved tryptophan-rich motif in the membrane-proximal region of the human immunodeficiency virus type 1 gp41 ectodomain is important for Env-mediated fusion and virus infectivity. *J Virol* 1999;73:2469-80.
39. Pancera M, Majeed S, Ban YE, *et al.* Structure of HIV-1 gp120 with gp41-interactive region reveals layered envelope architecture and basis of conformational mobility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:1166-71.
40. Miller MD, Geleziunas R, Bianchi E, *et al.* A human monoclonal antibody neutralizes diverse HIV-1 isolates by binding a critical gp41 epitope. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:14759-64.
41. Hrin R, Montgomery DL, Wang F, *et al.* Short communication: In vitro synergy between peptides or neutralizing antibodies targeting the N- and C-terminal heptad repeats of HIV Type 1 gp41. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2008;24:1537-44.
42. Wang RR, Yang LM, Wang YH, *et al.* Sifuvirtide, a potent HIV fusion inhibitor peptide. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;382:540-4.
43. Liu J, Deng Y, Dey AK, Moore JP, Lu M. Structure of the HIV-1 gp41 membrane-proximal ectodomain region in a putative prefusion conformation. *Biochemistry* 2009;48:2915-23.

44. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, Kuby J, eds. Immunology. 5th ed. New York: W. H. Freeman and Company; 2003.
45. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med* 2000;343:37-49.
46. Cuesta AM, Sainz-Pastor N, Bonet J, Oliva B, Alvarez-Vallina L. Multivalent antibodies: when design surpasses evolution. *Trends Biotechnol* 2010;28:355-62.
47. Holliger P, Hudson PJ. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol* 2005;23:1126-36.
48. Saerens D, Ghassabeh GH, Muyldermans S. Single-domain antibodies as building blocks for novel therapeutics. *Curr Opin Pharmacol* 2008;8:600-8.
49. Chan AC, Carter PJ. Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2010;10:301-16.
50. Beck A, Wurch T, Bailly C, Corvaia N. Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies. *Nat Rev Immunol* 2010;10:345-52.
51. Magliani W, Conti S, Cunha RLOR, Travassos LR, Polonelli L. Antibodies as Crypts of Antiinfective and Antitumor Peptides. *Current Medicinal Chemistry* 2009;16:2305-23.
52. Rothe A, Hosse RJ, Power BE. In vitro display technologies reveal novel biopharmaceutics. *FASEB J* 2006;20:1599-610.
53. Moutel S, Perez F. [Intrabodies, potent tools to unravel the function and dynamics of intracellular proteins]. *Med Sci (Paris)* 2009;25:1173-6.
54. Carter PJ. Potent antibody therapeutics by design. *Nat Rev Immunol* 2006;6:343-57.
55. Polonelli L, Ponton J, Elguezabal N, *et al.* Antibody Complementarity-Determining Regions (CDRs) Can Display Differential Antimicrobial, Antiviral and Antitumor Activities. *PLoS One* 2008;3:-.
56. Davies J, Riechmann L. Single antibody domains as small recognition units: Design and in vitro antigen selection of camelized, human VH domains with improved protein stability. *Protein Eng* 1996;9:531-7.
57. Brekke OH, Loset GA. New technologies in therapeutic antibody development. *Curr Opin Pharmacol* 2003;3:544-50.
58. Harmsen MM, De Haard HJ. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007;77:13-22.

59. BarbasIII CF, Burton DR, Scott JK, Silverman GJ, eds. Phage Display: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
60. Benhar I. Biotechnological applications of phage and cell display. *Biotechnol Adv* 2001;19:1-33.
61. Hoogenboom HR, de Bruine AP, Hufton SE, Hoet RM, Arends JW, Roovers RC. Antibody phage display technology and its applications. *Immunotechnology* 1998;4:1-20.
62. de Bruin R, Spelt K, Mol J, Koes R, Quattrocchio F. Selection of high-affinity phage antibodies from phage display libraries. *Nat Biotechnol* 1999;17:397-9.
63. Barbas CF, 3rd, Kang AS, Lerner RA, Benkovic SJ. Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:7978-82.
64. Schwartz O, Alizon M, Heard JM, Danos O. Impairment of T cell receptor-dependent stimulation in CD4<sup>+</sup> lymphocytes after contact with membrane-bound HIV-1 envelope glycoprotein. *Virology* 1994;198:360-5.
65. Spieker-Polet H, Sethupathi P, Yam PC, Knight KL. Rabbit monoclonal antibodies: generating a fusion partner to produce rabbit-rabbit hybridomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:9348-52.
66. Ohage E, Steipe B. Intrabody construction and expression. I. The critical role of VL domain stability. *J Mol Biol* 1999;291:1119-28.
67. Silva FNCA. Recombinant Intracellular Antibodies for Molecular Gene therapy of HIV-1 Infection. Lisboa: Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa; 2008.